Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Enzymkinetische Untersuchungen an Isoamylasen und Makroamylase

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
BARBARA HAILE
aus Stuttgart-Bad Cannstatt

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Enzymkinetische Untersuchungen an Isoamylasen und Makroamylase

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
BARBARA HAILE
aus Stuttgart-Bad Cannstatt

1983

Dekan:	Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Eggstein
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Malchow

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547619_0039

Herrn Prof. Dr. M. Eggstein danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.
Mein ganz besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. W. Stein, der mich mit seinen wertvollen Anregungen und Ratschlägen sehr unterstützt hat.

Nicht zuletzt danke ich Juta Heber für ihre Hilfe beim Erlernen der Methodik.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Methodik	3
2.1	Reagenzien und Geräte	3
2.2	Herstellung der Amylaselösungen	4
2.3	Bestimmung der Michaeliskonstanten K_m an 3 Substraten	8
2.3.1	Substrat: Amylose	8
2.3.2	Substrat: Oligosaccharide	10
2.3.3	Substrat: Maltotetraose	10
2.4	Berechnung der Michaeliskonstanten K_m	12
2.5	Temperaturverhalten der Amylasen	15
2.5.1	Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur	15
2.5.2	Thermische Stabilität des Gödecketestreagenzes (Substrat: Maltotetraose)	16
2.5.3	Thermische Stabilität der Amylasen	16
2.5.4	Stabilität der Amylasen bei Raumtemperatur	16
3.	Ergebnisse	17
3.1	Michaeliskonstanten	17
3.2	Temperaturverhalten der Amylasen	46
3.2.1	Optimale Reaktionstemperatur	46
3.2.2	Thermische Stabilität des Gödecketestreagenzes (Substrat: Maltotetraose)	46
3.2.3	Thermische Stabilität der Amylasen	48
3.2.4	Stabilität der Amylasen bei Raumtemperatur	53

UNIV. LEIDEN BIBL.

		Seite
4.	Diskussion	54
4.1	Testvergleich	54
4.2	Michaeliskonstanten	59
4.3	Temperaturverhalten	60
5.	Zusammenfassung	63
6.	Literaturverzeichnis	64

1. EINLEITUNG

Als Makroamylase bezeichnet man einen im Blut zirkulierenden makromolekularen Komplex, der Amylaseaktivität besitzt und aufgrund seiner Größe nicht über die Niere ausgeschieden werden kann.
Dies führt meist zu einer erhöhten Gesamtamylaseaktivität im Blut und zu einer stark erniedrigten Amylaseausscheidung im Urin.
Die Arbeiten (4, 6), die der Erstbeschreibung des Phänomens von 1964 (18) folgten, zeigten, daß es sich bei dem Komplex sehr wahrscheinlich um normale Amylase handelt, die in irgendeiner Form an eine makromolekulare Komponente gebunden ist. Diese Komponente konnte in einigen Fällen als Immunglobulin vom Typ IgA oder IgG identifiziert werden (4, 10, 11), in anderen Fällen war sie nicht weiter differenzierbar. Es dürfte sich aber sehr wahrscheinlich um verschiedene andere Serumproteine handeln. Polysaccharide, die im Experiment mit Amylase Makrokomplexe bildeten (16), sind bei noch keinem Fall nachgewiesen worden.

Ebenfalls ungeklärt ist die Art der Bindung der Amylase an die makromolekulare Komponente. Auch im Falle der Immunglobuline ist meist noch nicht eindeutig erwiesen, daß es sich um echte Antigen-Antikörper-Bindungen handelt.

Fest steht nur eins, die Heterogenität der Makroamylasen. Sie unterscheiden sich stark in Bezug auf Molekulargewicht, Dissoziationsfähigkeit, Affinität zu den verschiedenen Isoamylasen, immunologische Eigenschaften u.a. ...

Klinisch ist die Diagnose Makroamylase bis jetzt nur insofern von Bedeutung, als sie bei unklar erhöhten Amylasewerten in Betracht gezogen werden sollte, um dem Patienten unnötige Untersuchungen und Therapie zu ersparen. LONG und KOWLESSAR (12) fanden bei 5,9% der von ihnen untersuchten

Hyperamylasämiefälle Makroamylase als Ursache der Hyperamylasämie.
Untersuchungen über Makroamylase hier an der Klinik wurden möglich, nachdem bei einer Patientin Makroamylasämie festgestellt wurde. Die Patientin war durch hohe Amylasewerte im Blut und stark erniedrigte Amylaseclearance bei normaler Pankreas- und Nierenfunktion aufgefallen. Die amylasebindende Komponente konnte als Immunglobulin vom IgA-Kappa-Typ identifiziert werden. Es war vor allem Pankreasamylase im Komplex gebunden, wie auch im Urin der Patientin die Pankreasamylase überwog (3).
Mein Vorhaben war, die Makroamylase dieser Patientin mit normaler menschlicher Speichel- und Pankreasamylase und mit Pankreasamylase des Schweins enzymkinetisch zu vergleichen. Dazu untersuchte ich das Temperaturverhalten der Amylasen und bestimmte an drei verschiedenen Substraten ihre Michaeliskonstanten.
Um noch genauer den Einfluß der Bindung im Makrokomplex auf die Amylase zu untersuchen, wurde reine Pankreas- und reine Speichelmakroamylase in vitro hergestellt und deren Michaeliskonstanten mit denen der normalen Isoamylasen verglichen.

2. METHODIK

2.1 Reagenzien und Geräte

a) Merckotest "α-Amylase" der Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 3301
Testprinzip: Der Abbau des Substrats Amylose durch die Amylase wird nach einer bestimmten Reaktionszeit durch Zugabe einer HCl-Jodlösung gestoppt und die Abnahme der Blaufärbung der Lösung gegenüber dem Leerwert gemessen.

b) "UltraZyme Plus α-Amyl" der Fa. Harleco, Herstal (Liège), Belgien, Art.-Nr. 64982 und 64967
Testprinzip: Bei der kinetischen Methode nach Harleco wird das Substrat, Oligosaccharide aus 4 - 10 Glukosemolekülen, durch die Amylase zu Maltose abgebaut. Die Bildung der Maltose wird über 3 enzymatische Folgereaktionen anhand der NADH-Zunahme gemessen:

$$\text{Maltose} \xrightarrow{\alpha\text{-Glukosidase}} 2\ \text{Glukose}$$

$$\text{Glukose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Glu-6-P}^{1)} + \text{ADP}$$

$$\text{Glu-6-P} + \text{NAD}^{+} \xrightarrow{\text{G-6-PDH}^{2)}} \text{6-Phosphoglukonat} + \text{NADH} + \text{H}^{+}$$

c) "EnzAmyl-K" der Fa. Gödecke, Berlin, Art.-Nr. 847903
Testprinzip: Als Substrat wird Maltotetraose verwandt. Das Reaktionsschema lautet:

---

1) Glukose-6-Phosphat
2) Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

$$\text{Maltotetraose} + H_2O \xrightarrow{\alpha\text{-Amylase}} 2\ \text{Maltose}$$

$$\text{Maltose} + PO_4^{3-} \xrightarrow{\text{Maltose-Phosphorylase}} \text{Glukose} + \text{Glu-1-P}$$

$$\text{Glu-1-p}^{3)} \xrightarrow{\beta\text{-Phosphoglukomutase}} \text{Glu-6-P}$$

$$\text{Glu-6-P} + NAD^+ \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6-Phosphoglukonat} + NADH + H^+$$

d) ACA der Fa. Du Pont
Im ACA wird Maltopentaose als Substrat verwandt. Das Reaktionsschema lautet:

$$\text{Maltopentaose} \xrightarrow{\alpha\text{-Amylase}} \text{Maltotriose} + \text{Maltose}$$

$$\text{Maltotriose} + \text{Maltose} \xrightarrow{\alpha\text{-Glukosidase}} 5\ \text{Glukose}$$

$$\text{Glukose} + ATP \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Glu 6-P} + ADP$$

$$\text{Glu-6-P} + NAD^+ \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6-Phosphoglukonat} + NADH + H^+$$

Die manuellen Bestimmungen wurden mit dem Photometer 1101 M von Eppendorf durchgeführt, die Aufzeichnung erfolgte mit dem Kompensationsschreiber 4410 und der Transformationsstufe L 1853 von Eppendorf.

2.2 Herstellung der Amylaselösungen

a) Speichelamylase: 10 ml Speichel wurden mit 90 ml 0,9%-NaCl verdünnt, zentrifugiert, und der klare Überstand wurde gesammelt.

---

3) Glukose-1-Phosphat

b) Schweinepankreasamylase: 3g Pankreon Granulat, hergestellt aus Pankreasextrakt des Schweins (Fa. Kali-Chemie, Pharma GmbH Hannover), wurde in 100 ml 0,9%-NaCl aufgelöst und die Lösung ebenfalls solange zentrifugiert, bis sie klar war.

c) Makroamylase: Serum der Patientin wurde gesplittet und bei -18°C ohne Zusätze tiefgefroren aufbewahrt.

d) Pankreasamylase: Bei der K_m-Bestimmung am Substrat Amylose wurde bei der Gastroskopie gewonnenes Duodenalsekret benutzt, bei allen übrigen Versuchen chromatographisch gereinigte Pankreasamylase:
Aus der Pankreasfistel eines Patienten gewonnenes Sekret wurde mit einem Amiconkonzentrator an einer Membran UM 10 zehnfach konzentriert; 4 ml der so erhaltenen Lösung wurden chromatographiert.
Die Chromatographie erfolgte an Sephadex G 200 (Bettvolumen 85 x 2,5 cm), Laufmittel war 50 mmol/l Trispuffer (pH 8) + 100 mmol/l NaCl.
Die Fraktionen wurden mit dem Gödecketest auf Amylaseaktivität geprüft, amylasehaltige Fraktionen gepoolt und wie oben beschrieben konzentriert. So erhielten wir ca. 4 ml hochkonzentrierte Pankreasamylasenlösung (400 000 U/l im Mercktest).

Die unter a) - d) beschriebenen Stammlösungen hatten eine für die kinetischen Untersuchungen viel zu hohe Amylaseaktivität. Deshalb wurde eine jeweils ausreichende Menge der Stammlösung mit Rinderalbuminlösung (3 g/l, Ezyme diluent von Du Pont) auf 200 - 400 U/l (Mercktest) verdünnt und in Fraktionen eingefroren (-20°C). Die Rinderalbuminlösung war zuvor untersucht worden. Sie besaß keine Amylaseaktivität.

e) Herstellung von reiner Pankreas- und reiner Speichelmakroamylase (Pankreas-MA und Speichel-MA):

Diese Makroamylasen wurden wie von ILS (8) beschrieben hergestellt. Gereinigte Pankreas- und Speichelamylaselösung wurde mit Rinderalbumin (3 g/l) auf eine Aktivität von ca. 10 000 U/l (Harlecotest) verdünnt. Zu jeweils 400 µl der aus dem Serum der Patientin gewonnenen ABPF (amylasebindende Proteinfraktion) wurden im Überschuß 400 µl der Isoamylasen zugegeben, um die Bindungsplätze für Amylase abzusättigen. Neben der nun gebildeten Makroamylase lag deshalb noch freie Amylase in den beiden Lösungen vor. Eine chromatographische Reinigung der Makroamylasen, diesmal an Sephacryl S 300-sf (Bettvolumen 55 x 0,9 cm, Laufmittel s.o., Fraktionsvolumen 440 µl) war notwendig. Die Fraktionen wurden mit dem Harlecotest bei 37°C Reaktionstemperatur auf Amylaseaktivität überprüft.

Abb. 1 zeigt die chromatographische Reinigung der Pankreasmakroamylaselösung. Die Kurven für die Speichel-MA waren fast identisch. Beidesmal zeigte die Amylaseaktivität einen ersten Peak zwischen den Fraktionen 35 - 55 und einen zweiten, größeren zwischen der 65. und 80. Fraktion. Der erste kleinere Peak, der sich im Bereich der höhermolekularen Fraktionen befindet, entspricht der Makroamylase.

Die Fraktionen 35 - 55 wurden gepoolt und im Amiconkonzentrator wie oben beschrieben konzentriert. Ich erhielt ca. 1,5 ml reine Pankreas-MA (50 U/l im Gödecketest) und ca. 0,9 ml reine Speichel-MA (150 U/l im Gödecketest). Beide wurden nicht mehr eingefroren, sondern sofort für die K_m-Bestimmung verwandt.

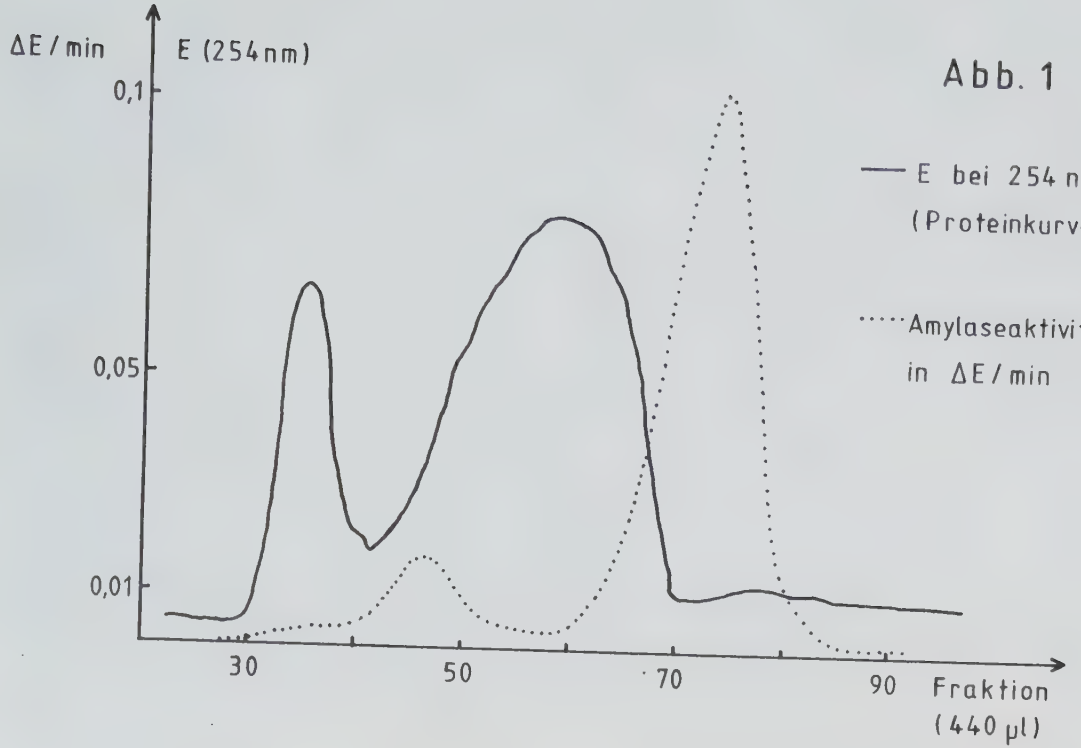

ΔE / min
E (254nm)
0,1
0,05
0,01
30
50
70
90
Fraktion
(440 µl)
E bei 254 nm
(Proteinkurve)
Amylaseaktivität
in ΔE / min

Abb. 1

2.3 Bestimmung der Michaeliskonstanten K_m an 3 Substraten

Die Michaeliskonstanten der 3 Isoamylasen und der Makroamylase der Patientin wurden an allen 3 Substraten bestimmt, die der Pankreas- und Speichel-MA nur mit Maltotetraose als Substrat.

2.3.1 Substrat: Amylose

Durch Zusatz steigender Mengen der Pufferlösung zur Substratlösung erhielt ich folgende 8 Amylosekonzentrationen: 0,58, 0,4, 0,29, 0,2, 0,16, 0,12, 0,08 und 0,04 g/l. Puffer- und Farbreagenzlösung wurden nach Originalvorschriften hergestellt.
Versuchsdurchführung: Im 37°C-Wasserbad wurden ca. 6 ml Substratlösung vorgewärmt (10 - 15 Min.) und danach wie folgt verteilt:

a) Für die Leerwertbestimmung wurden in 3 Reagenzgläser je 1 ml Substratlösung + 10 ml Farbreagenz gegeben. Nach 5 - 10 Min. im 25°C-Bad wurde die Extinktion E bei 623 nm gegen dest. Wasser gemessen.

b) Reaktionsansatz: Durch die Zugabe von 20 µl Amylaselösung zu 2 ml Substratlösung wurde die Reaktion gestartet. Das Reaktionsgemisch blieb im 37°C-Bad. In bestimmten Zeitabständen wurden jeweils 100 µl entnommen, zu 1 ml Farbreagenz pipettiert und nach 5 - 10 Min. im 25°C-Bad die Extinktion wie beim Leerwert beschrieben gemessen.

Die Extinktion E der Proben wurde nun gegen die Entnahmezeit t aufgetragen. Beispiele der so erhaltenen E/t-Kurven zeigt Abb. 2 (am Kurvenende sind die jeweiligen Substratkonzentrationen angegeben).
Die Reaktionsgeschwindigkeit v, ausgedrückt in $\Delta E/min$, wurde dadurch ermittelt, daß für die im linearen Teil der Kurve liegenden Punkte (mindestens 3, meist 4 - 5) mittels linearer Regression die beste Anpassungsgerade errechnet

wurde. Ihre Steigung entspricht $\Delta E/min$.
Die Bestimmung der Leerwerte wurde zur Kontrolle der Substratlösungen durchgeführt, zur Berechnung von v wurde der Leerwert nicht benötigt.
Es wurden immer Doppelbestimmungen ausgeführt, d.h. jeweils 2 Reaktionsansätze für eine Substratkonzentration. Bei der Makroamylase, die besonders interessierte, wurden Vier- und Fünffachbestimmungen durchgeführt.

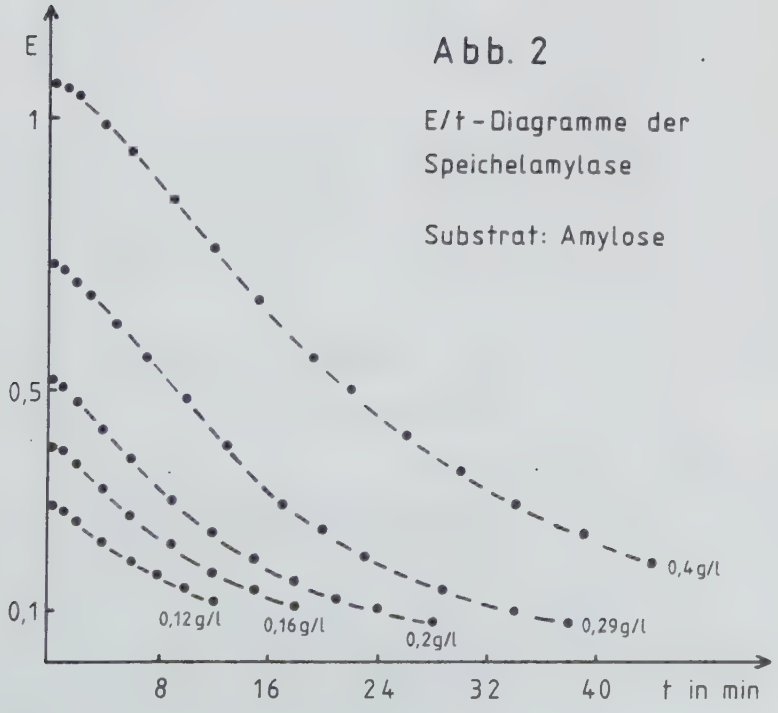


Abb. 2

E/t-Diagramme der Speichelamylase

Substrat: Amylose

2.3.2 Substrat: Oligosaccharide

Das Originalreagenz enthält alle Enzyme und Substrate und hat eine Oligosaccharidkonzentration von 3,5 g/l. Durch Verdünnen dieser Stammlösung mit dest. Wasser wurden folgende Konzentrationen hergestellt: 2,8, 2,1, 1,4, 1,05, 0,88, 0,7, 0,53, 0,35 und 0,18 g/l.
Versuchsdurchführung: Im Gegensatz zum Originaltest wurde die Reaktion bei 30°C gemessen. Der Reaktionsansatz wurde wiederum verdoppelt, um die Pipettierfehler geringer zu halten.
2 ml Substratlösung wurde im Photometer ca. 10 Min. lang bei 30°C (Küvettentemperatur) inkubiert, dann wurden 20 µl Amylase dazupipettiert und die Extinktionszunahme bei 334 nm kontinuierlich gemessen. Da das Reagenz einen von der Verdünnung abhängigen Reagenzienleerwert besaß, wurde dieser für jede Substratkonzentration ebenfalls bestimmt.

Abb. 3 zeigt in vereinfachter Form Schreiberkurven, am Kurvenende sind wiederum die jeweiligen Substratkonzentrationen angegeben.
ΔE/min wurde graphisch ermittelt. Zuerst wurde durch Anlegen einer Geraden an den linearen Teil der Kurve die Steigung ermittelt. Nach Abzug des dazugehörigen Reagenzienleerwertes erhielt ich dann ΔE/min, das der Reaktionsgeschwindigkeit entspricht.
Bei jeder Mehrfachbestimmung wurden die Substratverdünnungen wieder aus einer neuen Stammlösung hergestellt.

2.3.3 Substrat: Maltotetraose

Die Konzentration der Maltotetraose im Originalreagenz, das ebenfalls alle Enzyme und Substrate enthält, beträgt 5 g/l. Durch Verdünnen mit dest. Wasser wurden folgende Konzentrationen hergestellt: 4, 3, 2,5, 2, 1,75, 1,5, 1,25, 1, 0,75 und 0,5 g/l.
Versuchsdurchführung: Die Reaktionstemperatur betrug 30°C,

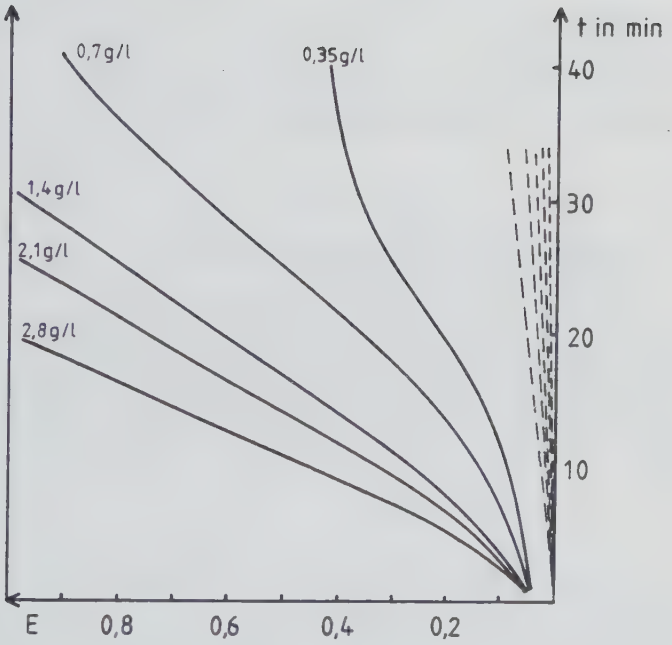


Abb. 3

—— E/t-Kurven der Reaktion

– – – E/t-Kurven der Reagenzienleerwerte

Makroamylase
Substrat: Oligosaccharid (Harleco)

die Extinktionszunahme wurde bei 334 nm gemessen. Der Reaktionsansatz war hier 1 ml Substratlösung + 40 µl Amylase.

Der Reagenzienleerwert war so gering, daß er vernachlässigt werden konnte.
ΔE/min wurde ebenfalls durch Anlegen einer Geraden an den linearen Teil der Kurven bestimmt.

2.4 Berechnung der Michaeliskonstanten K_m

Die Versuchsergebnisse wurden in den Diagrammen nach LINEWEAVER-BURK, HANES und EADIE-HOFSTEE und im direkten linearen Diagramm nach EISENTHAL und CORNISH-BOWDEN dargestellt. Alle 4 Diagramme (2) gehen von der Michaelis-Mentengleichung

$$v = \frac{V \times S}{K_m + S} \qquad \text{Gl.1}$$

aus. Hierbei ist S die variable Substratkonzentration, v die jeweilige Reaktionsgeschwindigkeit, K_m die Michaeliskonstante und V die maximal erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit.
Durch Umkehrung von Gl.1 erhält man die Gleichung

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V \times S} \qquad \text{Gl.2,}$$

die dem LINEWEAVER-BURK-Diagramm zugrunde liegt. In diesem am häufigsten benutzten Diagramm werden die Meßwerte in doppelt reziproker Form, 1/v gegen 1/S aufgetragen.

Eine weitere Umformung, die Multiplikation von Gl.2 mit S, führt zur Gleichung

$$\frac{S}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{S}{V} \qquad \text{Gl.3,}$$

von der das HANES-Diagramm ausgeht. S/v wird gegen S auf-

getragen.
Multipliziert man G1.2 dagegen mit v x V, so entsteht die Gleichung

$$v = V - \frac{K_m \times v}{S} \qquad \text{G1.4,}$$

die dem EADIE-HOFSTEE-Diagramm zugrunde liegt. v wird gegen v/S aufgetragen.

In den Diagrammen nach LINEWEAVER-BURK, HANES und EADIE-HOFSTEE ergibt die Auftragung der Meßwerte Geraden, die die Koordinatenachsen in bestimmten Punkten schneiden. Tab. 1 zeigt, wie aus diesen Schnittpunkten oder aus der Steigung der Geraden K_m ermittelt werden kann. Bei meiner Arbeit errechnete ich K_m im EADIE-HOFSTEE-Diagramm über die Geradensteigung, in den beiden anderen Diagrammen über die Schnittpunkte der Geraden mit der x-Achse (in der Tabelle angekreuzt).

Tab. 1: Berechnung der K_m aus den 3 linearen Diagrammen

	x-Achse	y-Achse	Schnittpunkte mit x-Achse	Schnittpunkte mit y-Achse	Geradensteigung
EADIE-HOFSTEE	v/S	v	V/K_m	V	$-K_m$*
HANES	S	S/v	$-K_m$*	K_m/V	1/V
LINE-WEAVER-BURK	1/S	1/v	$-1/K_m$*	1/V	K_m/V

S = Substratkonzentration V = Maximalgeschwindigkeit
v = Reaktionsgeschwindigkeit K_m = Michaeliskonstante

Der Vorteil der Diagramme von LINEWEAVER-BURK, HANES und EADIE-HOFSTEE, die ich im folgenden immer wieder zusammenfassend als die 3 linearen Diagramme bezeichnen werde, liegt darin, daß die Meßergebnisse in linearer Form dar-

gestellt sind. Aus systematischen Abweichungen von der Geraden kann man auf ganz bestimmte Reaktionsmechanismen (Kooperation, verschiedene Hemmtypen) schließen.
Allerdings sind bei der Berechnung der K_m aus den 3 linearen Diagrammen bestimmte Nachteile zu beachten, die zu entsprechenden Fehlern führen können (2): Im HANES-Diagramm z.B. geht S in beide Koordinatenachsen ein. Die Koordinaten der Meßpunkte sind also nicht mehr unabhängig voneinander. Für das Diagramm nach EADIE-HOFSTEE gilt dasselbe, nur daß hier v in beide Achsen eingeht. Im LINEWEAVER-BURK-Diagramm liegen die Meßpunkte mit abnehmender S immer weiter auseinander, was zu einer Überbewertung der Meßpunkte im niederen S-Bereich führt.
Alle diese Nachteile entfallen bei dem erst 1974 eingeführten "direkten linearen Diagramm" von EISENTHAL und CORNISH-BOWDEN (5). Vergleiche (2, 14) zeigten, daß mit diesem Diagramm K_m am genauesten bestimmt werden kann:
Auf der negativen Abszisse wird die jeweilige Substratkonzentration aufgetragen, auf der Ordinate die dazugehörige Reaktionsgeschwindigkeit und beide werden durch eine Gerade miteinander verbunden. Man erhält so eine ganze Schar von Geraden, die sich theoretisch in einem Punkt schneiden, dessen Abszisse K_m entspricht und dessen Ordinate V ist. Im Versuch bilden die Schnittpunkte der Geraden eine Punktwolke, K_m ist der Median aller Abszissenwerte der Schnittpunkte, V entsprechend der Median der Ordinaten der Schnittpunkte.
Der Nachteil des Diagramms von EISENTHAL und CORNISH-BOWDEN liegt darin, daß Reaktionsmechanismen, die nicht der Michaelis-Menten-Gleichung folgen, schlechter als in den 3 linearen Diagrammen identifiziert werden können.

Um die Vorteile der verschiedenen Diagramme auszunutzen, wurde immer folgendermaßen vorgegangen:
Die Versuchsergebnisse (Mittelwerte der Mehrfachbestimmungen) wurden zunächst in den Diagrammen nach LINEWEAVER-BURK, HANES und EADIE-HOFSTEE dargestellt. Nur die im li-

nearen Bereich der dabei erhaltenen Kurven (siehe Ergebnisse) liegenden Punkte wurden zur K_m-Bestimmung nach EISENTHAL und CORNISH-BOWDEN verwandt. Für die K_m-Bestimmung wurde das direkte lineare Diagramm in sehr großem Maßstab (DIN A 2) erstellt, und alle Mehrfachbestimmungen wurden berücksichtigt (jeder einzelnen Messung entspricht eine Gerade im Diagramm).
Mit Hilfe der KENDALL-Statistik, deren Anwendung auf das direkte lineare Diagramm PORTER und TRAGER (15) beschrieben haben, wurden die Grenzen bestimmt, innerhalb derer K_m mit 95% Wahrscheinlichkeit liegt.
Zum Vergleich wurden die K_m-Werte auch aus den anderen Diagrammen ermittelt (ebenfalls nur aus den im linearen Kurventeil liegenden Punkten). Die Geraden wurden mittels linearer Regression bestimmt, ihre Schnittpunkte mit den Achsen rechnerisch ermittelt.

2.5 Temperaturverhalten der Amylasen

Alle Versuche wurden nur mit den 3 Isoamylasen und mit der Makroamylase der Patientin durchgeführt. Die Amylaseaktivität wurde mit Maltotetraose als Substrat bestimmt, da dieser Test am wenigsten Zeitaufwand erforderte.

2.5.1 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur

Bei 15°C beginnend wurde die Reaktionstemperatur um jeweils 5°C auf 50°C erhöht. Im Bereich des Steilabfalls der Kurven (siehe Ergebnisse) wurde die Reaktion zusätzlich noch bei 47,5°C gemessen. Es wurde so vorgegangen, daß zunächst im Photometer die gewünschte Temperatur eingestellt wurde, dann die Substratlösung ca. 10 Min. im Photometer vortemperiert wurde und zuletzt die Amylase dazupipettiert wurde.

Während des ganzen Versuchs wurden immer Doppelbestimmungen

durchgeführt.
Nach der letzten Messung (bei 47,5°C) wurden die 2 Proben der Schweinepankreasamylase im Photometer wieder auf 40°C heruntergekühlt und nochmals die Amylaseaktivität in diesen Proben bestimmt.

2.5.2 Thermische Stabilität des Gödecketestreagenzes (Substrat: Maltotetraose)

Das Testreagenz wurde ca. 20 Min. lang bei 47°C, 55°C und 65°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde es im Photometer ca. 10 Min. lang auf 30°C abgekühlt. Zuletzt wurde Amylase (Raumtemperatur) dazugegeben und die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt.
Zum Vergleich wurde jeweils die gleiche Amylase zu Testreagenz gegeben, das nur auf 30°C erwärmt worden war. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde ebenfalls bei 30°C gemessen.

2.5.3 Thermische Stabilität der Amylasen

Die Amylaselösungen wurden 2 - 3 Stunden bei 47°C, 55°C und 65°C im Wasserbad inkubiert. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen und deren Aktivität bestimmt (30°C Reaktionstemperatur, Doppelbestimmungen).
Da das Verhalten der Makroamylase in diesem Versuch überraschte, wurde er wiederholt, wobei die Amylaseaktivität einmal mit Maltopentaose als Substrat, also im ACA, und einmal mit Oligosacchariden (Harleco) als Substrat gemessen wurde.

2.5.4 Stabilität der Amylasen bei Raumtemperatur

Die Amylasen wurden einen Monat lang bei Raumtemperatur stehengelassen und die Aktivität alle 1 - 2 Tage bestimmt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Michaeliskonstanten

Die Reaktionsgeschwindigkeiten, die bei den Versuchen gemessen wurden, sind, ausgedrückt in ΔE/min, in Tab. 2 - 4 (S. 20ff) aufgelistet.
Die Abbildungen 5 - 7 (S. 32ff) zeigen die Darstellung der Meßwerte in den Diagrammen von LINEWEAVER-BURK, HANES und EADIE-HOFSTEE und zusätzlich die einfache Auftragung von v gegen S. In den 3 linearen Diagrammen sind jeweils die Geraden miteingezeichnet, die zur Bestimmung von K_m dienten.
Abb. 4 (S. 27ff) zeigt die Diagramme von EISENTHAL und CORNISH-BOWDEN, in denen nur noch die Meßergebnisse dargestellt sind, die zur K_m-Bestimmung verwandt wurden. Die ursprünglich in großem Maßstab und unter Berücksichtigung aller Einzelmessungen erstellten Diagramme sind hier in kleinem Maßstab und vereinfacht dargestellt. Es sind der Übersicht wegen nur Mittelwerte aufgetragen. Für die Abb. 4 - 7 gilt:

v = Reaktionsgeschwindigkeit in ΔE/min
S = Substratkonzentration in g/l
● = Meßpunkt, der zur K_m-Bestimmung verwandt wurde
▫ = Meßpunkt, der bei der K_m-Bestimmung unberücksichtigt blieb

In dem Versuch, in dem Amylose (Merck) Substrat war, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit v bei 8 verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Bei der Auftragung der Meßwerte (Tab. 2) in den 3 linearen Diagrammen (Abb. 5) ergaben sich keine systematischen Abweichungen von der Linearität und so wurden alle 8 Konzentrationen zur K_m-Bestimmung benutzt.
In den Versuchen, bei denen Oligosaccharide und Maltotetraose als Substrat verwandt wurden, fiel bei der Darstel-

lung in den 3 linearen Diagrammen (Abb. 6 und 7) auf, daß keine Geraden sondern leicht gekrümmte Kurven entstanden, wobei die Krümmung in den Randbereichen stark zunahm. Deswegen wurden nach den ersten Messungen die entsprechenden Konzentrationen weggelassen und weitere im Mittelbereich dazugenommen. Die K_m-Bestimmung geschah im Falle der Oligosaccharide (Harleco) unter Berücksichtigung der Konzentrationen 2,8 - 0,53 g/l und im Falle der Maltotetraose (Gödecke) mit den Konzentrationen 5 - 1 g/l (je einschließlich).
Bei der in vitro hergestellten Pankreas- und Speichelmakroamylase, bei denen die Michaeliskonstanten nur am Substrat Maltotetraose ermittelt wurden, wurden gleich von vornherein nur Messungen im Konzentrationsbereich 5 - 1 g/l durchgeführt.

Die im Diagramm nach EISENTHAL und CORNISH-BOWDEN ermittelten K_m-Werte samt 95%-Wahrscheinlichkeitsbereich sind in Tab. 5 (S. 25) aufgeführt:
Bei allen 3 Substraten hat die Schweinepankreasamylase die jeweils niedrigste K_m; es folgt die Pankreasamylase, dann die Makroamylase und zuletzt die Speichelamylase, die die höchste K_m besitzt, also die geringste Affinität zum Substrat hat.
In den Versuchen, in denen Amylose und Oligosaccharide Substrat waren, liegen die Schweinepankreas- und die humane Pankreasamylase sehr dicht beieinander. Beim Substrat Maltotetraose jedoch hat die Schweinepankreasamylase einen deutlich niedrigeren Wert als die humane Pankreasamylase. Die Speichelamylase setzt sich bei allen 3 Substraten am stärksten von den anderen ab. Die Makroamylase liegt immer näher an der Pankreasamylase, hat aber einen deutlich höheren K_m-Wert als diese. Die K_m-Werte der in vitro hergestellten Pankreas- und Speichelmakroamylase liegen über denen der entsprechenden normalen Amylasen.
Insgesamt liegen die Werte beim Substrat Amylose am niedrigsten und bei der Maltotetraose am höchsten: Die Amyla-

sen haben zur Amylose die größte Affinität, zur Maltotetraose die geringste.

Tab. 6 (S. 26) zeigt die K_m-Werte, die zu Vergleichszwecken aus den 3 linearen Diagrammen berechnet wurden. Obwohl die Zahlenwerte nicht genau mit denen der Tab. 5 und auch nicht genau untereinander übereinstimmen, stehen doch die K_m-Werte in der prinzipiell gleichen Relation zueinander wie in Tab. 5, d.h. man gelangt zu den gleichen Ergebnissen.

Tab. 2: Substrat: Amylose (Merck)

S	v in ΔE/min					
	Schweinepankreas-amylase		Pankreasamylase		Speichelamylase	
0,58	0,0232	0,0227	0,04	0,0395	0,0362	0,0356
0,4	0,0237	0,0216	0,0355	0,0409	0,0357	0,0248
0,29	0,0221	0,0223	0,04	0,0349	0,0279	0,025
0,2	0,0223	0,0218	0,0378	0,0349	0,0263	0,0265
0,16	0,018	0,0219	0,0404	0,0285	0,021	0,0237
0,12	0,0186	0,016	0,0328	0,0334	0,0196	0,0171
0,08	0,0159	0,0136	0,0249	0,0241	0,0127	0,0146
0,04	0,011	0,0146	0,0165	0,018	0,0095	0,0084

S	Makroamylase				
0,58	0,0277	0,0208	0,02	0,0228	
0,4	0,0183	0,0215	0,0205	0,0207	
0,29	0,0185	0,0165	0,0193	0,0176	
0,2	0,0148	0,0214	0,0106	0,0159	
0,16	0,0155	0,0134	0,0134	0,0154	
0,12	0,0116	0,0107	0,0134	0,0142	0,0129
0,08	0,0114	0,0128	0,0129	0,0082	0,0122
0,04	0,0081	0,0093	0,0081	0,0076	0,0065

Tab. 3: Substrat: Oligosaccharide (Harleco)

v in ΔE/min

S	Schweinepankreasamylase					
3,5	0,0911	0,0924	0,0874	0,0868		
2,8	0,0874	0,0881	0,0897	0,089	0,0902	0,0879
2,1	0,0852	0,0876	0,0852	0,085	0,083	0,0845
1,4	0,0769	0,0778	0,0793	0,079	0,0776	0,0791
1,05	0,069	0,0694	0,0708	0,0702	0,0709	0,0688
0,88					0,0644	0,0623
0,7	0,0515	0,054	0,056	0,0568	0,0569	0,0562
0,53					0,0438	0,0424
0,35	0,0263	0,0258	0,0248	0,0259	0,0293	0,0281
0,18	0,0088	0,0089	0,0084	0,0086		

S	Makroamylase				
3,5	0,0494	0,0529	0,0527		
2,8	0,0483	0,0502	0,0495	0,0496	0,0508
2,1	0,0442	0,0461	0,0464	0,0461	0,0473
1,4	0,038	0,0395	0,0395	0,0396	0,0409
1,05		0,0345	0,0343	0,0373	0,0372
0,88				0,0332	0,0336
0,7	0,0252	0,027	0,0274	0,0285	0,0295
0,53				0,022	0,0223
0,35	0,0132	0,0144	0,0146	0,0149	0,0146
0,18	0,0047	0,0052	0,0051		

S	Speichelamylase				
3,5	0,0585	0,0592	0,0591		
2,8	0,0575	0,0581	0,0572	0,0527	0,0524
2,1	0,0532	0,0519	0,0529	0,0518	0,0519
1,4	0,0435	0,0456	0,0433	0,0425	0,0431
1,05		0,0377	0,0445	0,0364	0,0372
0,88				0,0328	0,0307
0,7	0,0283	0,0282	0,0275	0,027	0,0277
0,53				0,0219	0,0224
0,35	0,0142	0,014	0,0149	0,0136	0,0141
0,18	0,0051	0,0048	0,0053		

Tab. 3: Fortsetzung Substrat: Oligosaccharide (Harleco)

	v in ΔE/min						
S	Pankreasamylase						
3,5	0,0545	0,0534	0,0561	0,0554	0,055		
2,8	0,0533	0,0543	0,0527	0,0533		0,0543	0,054
2,1	0,0505	0,0497	0,0496	0,0518	0,0523	0,0516	0,0518
1,4	0,0458	0,0451	0,0457	0,0466	0,046	0,047	0,0476
1,05		0,0388	0,0406	0,0402	0,0405	0,0415	0,0431
0,88						0,0385	0,0384
0,7	0,0308	0,0305	0,0321	0,0321	0,033	0,033	0,033
0,53						0,0265	0,0273
0,35	0,0188	0,017	0,0183	0,0176	0,0173	0,0177	0,0179
0,18	0,0064	0,0057	0,007	0,0083	0,008		

Tab. 4: Substrat: Maltotetraose (Gödecke)

S	v in ΔE/min Schweinepankreasamylase					
5	0,025	0,0248	0,0248	0,0226	0,0226	0,0227
4	0,0231	0,0235	0,0235	0,0212	0,0211	0,021
3	0,0223	0,0222	0,0221	0,0202	0,0203	
2,5	0,0212	0,0212	0,021	0,0195	0,0194	0,0194
2	0,0211	0,021		0,0179		
1,75	0,02	0,0198		0,0178	0,0176	
1,5	0,0185	0,0184		0,0165	0,0166	
1,25	0,0173	0,0167		0,015	0,0146	
1	0,0158	0,0152		0,0138	0,0138	
0,75	0,0122	0,0107		0,0113	0,0118	

S	v in ΔE/min Pankreasamylase					
5	0,0516	0,0527	0,0509	0,0512	0,0515	0,0508
4	0,0491	0,0494	0,0505	0,0491	0,0477	0,0473
3	0,0451	0,0475	0,0475	0,0444	0,0443	0,0445
2	0,0407	0,0415	0,042	0,039	0,0399	0,0398
1,5	0,0358	0,0384	0,0367	0,0332	0,0334	0,0338
1,25	0,0319	0,032	0,0321	0,0305	0,031	0,0306
1	0,0281	0,0272	0,0289	0,0254	0,026	0,0251
0,75	0,0184	0,0181	0,0182	0,0191	0,02	0,0197

S	v in ΔE/min Makroamylase				
5	0,0495	0,0505	0,0508	0,0492	0,0497
4	0,049	0,049	0,049	0,0476	0,0473
3	0,0449	0,0456	0,0454	0,0439	0,0442
2	0,0415	0,0411	0,0407	0,0392	0,0386
1,5	0,0334	0,0339	0,0338	0,0329	0,0326
1,25	0,0292	0,03	0,0307	0,0296	0,0297
1	0,0244	0,0244	0,0252	0,0251	0,0246
0,75	0,017	0,0168	0,0164	0,0166	0,0168

Tab. 4: Fortsetzung Substrat: Maltotetraose (Gödecke)

S	v in ΔE/min Speichelamylase					
5	0,0794	0,0798	0,0817	0,0775	0,0781	0,0769
4	0,0768	0,0776	0,0767	0,0734	0,0747	0,0732
3	0,0711	0,0694	0,072	0,0687	0,0683	0,0681
2	0,0504	0,0655	0,0594	0,058	0,0576	0,0627
1,5	0,0495	0,0495	0,0505	0,0475	0,0475	0,0474
1,25	0,0436	0,0443	0,0435	0,0425	0,0423	0,0414
1	0,0345	0,0351	0,0354	0,0355	0,035	0,0341
0,75	0,0253	0,0257	0,0258	0,0255	0,0236	0,0232

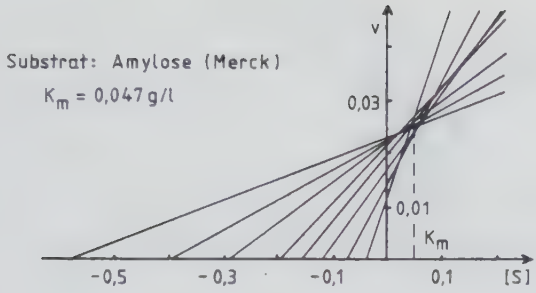
S	v in ΔE/min Speichel-MA			Pankreas-MA		
5	0,0719	0,0722	0,0713	0,0241	0,024	0,0242
4	0,0672	0,0671	0,0672	0,0226	0,0225	0,0222
3,5				0,0212	0,0214	
3	0,0619	0,0618	0,0617	0,0205	0,0205	0,0201
2,5	0,0556	0,0554		0,0191	0,0189	
2	0,0517	0,0513	0,0515	0,018	0,0177	0,0175
1,5	0,0427	0,0426	0,0423	0,0149	0,0149	0,0148
1,25	0,0361	0,0356	0,0358	0,0136	0,0138	0,0137
1	0,0293	0,0288		0,011	0,0111	

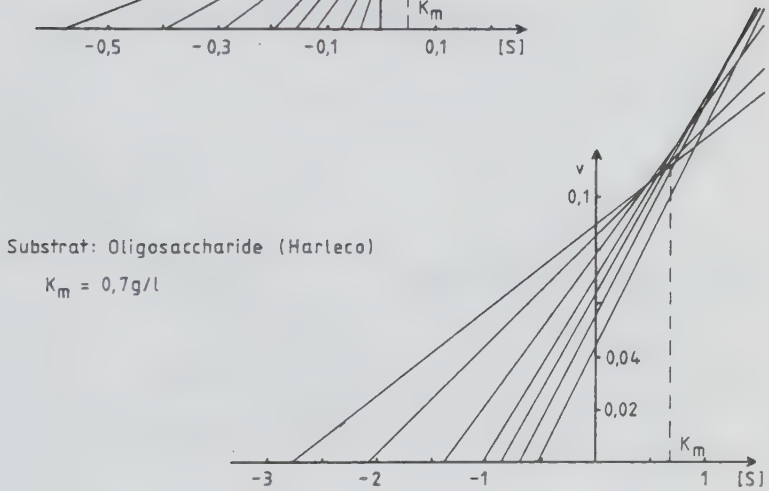
Tab. 5: K_m-Werte der 3 Isoamylasen und der Makroamylasen in g/l nach EISENTHAL und CORNISH-BOWDEN, in Klammern der 95%-Wahrscheinlichkeitsbereich

Substrat	Schweine-pankreas-amylase	Pankreas-amylase	Makro-amylase	Speichel-amylase	Pankreas-MA	Speichel-MA
Amylose	0,047 (0,026-0,066)	0,058 (0,041-0,077)	0,09 (0,07-0,124)	0,159 (0,127-0,219)		
Oligo-saccharide	0,7 (0,64-0,79)	0,8 (0,73-0,86)	1,05 (0,92-1,13)	1,56 (1,43-1,64)		
Maltote-traose	0,89 (0,81-1,01)	1,37 (1,27-1,46)	1,62 (1,48-1,8)	2,22 (2-2,35)	1,76 (1,69-1,84)	2,51 (2,13-3,06)

Tab. 6: K_m-Werte der 3 Isoamylasen und der Makroamylasen in g/l nach LINEWEAVER-BURK, HANES und EADIE-HOFSTEE

Diagramm	Substrat	Schweine-pankreas-amylase	Pankreas-amylase	Makro-amylase	Speichel-amylase	Pankreas-MA	Speichel-MA
EADIE & HOFSTEE	Amylose	0,041	0,061	0,087	0,159		
	Oligosaccharide	0,81	0,81	1,02	1,53		
	Maltotetraose	0,87	1,4	1,58	2,15	1,81	2,57
HANES	Amylose	0,042	0,049	0,125	0,173		
	Oligosaccharide	0,73	0,75	1	1,46		
	Maltotetraose	0,86	1,34	1,48	2,02	1,81	2,48
LINE-WEAVER-BURK	Amylose	0,04	0,068	0,076	0,154		
	Oligosaccharide	0,98	0,9	1,17	1,67		
	Maltotetraose	0,9	1,49	1,79	2,41	1,95	3,14





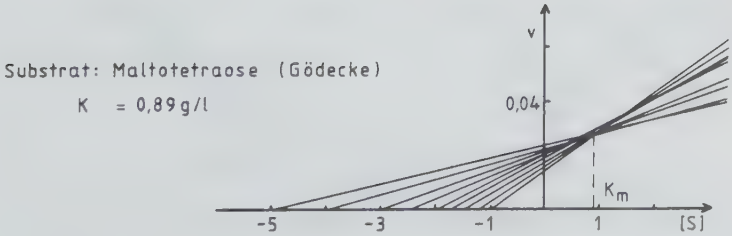


Abb. 4a Schweinepankreasamylase
Diagramme nach Eisenthal und Cornish-Bowden

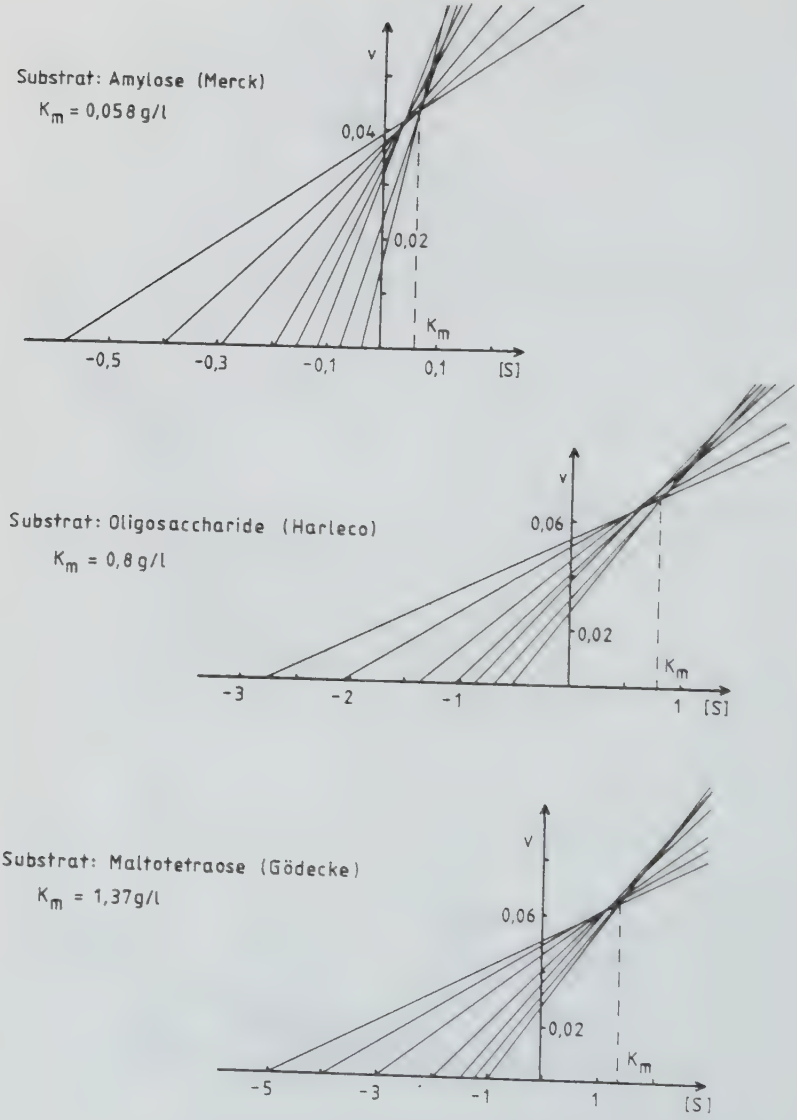
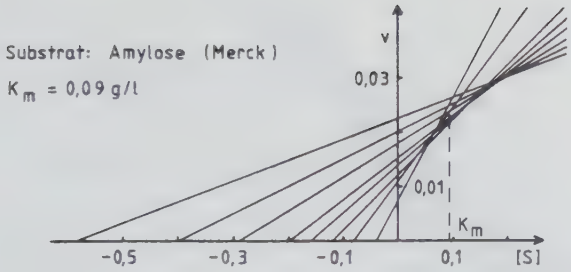
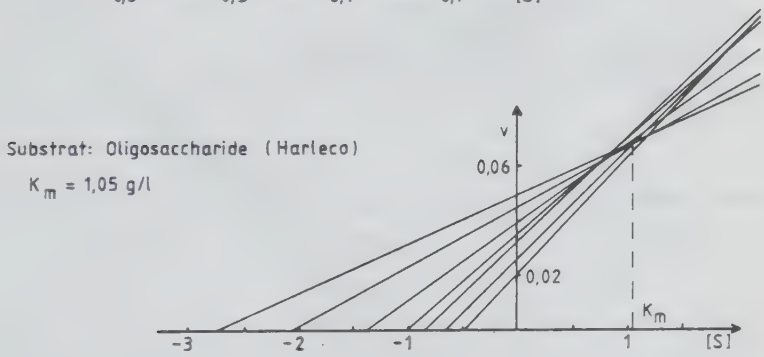


Abb. 4b Pankreasamylase
Diagramme nach Eisenthal und Cornish-Bowden





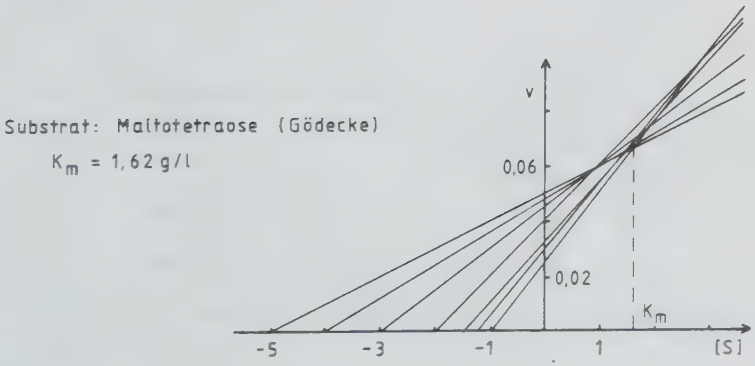


Abb. 4c Makroamylase

Diagramme nach Eisenthal und Cornish-Bowden

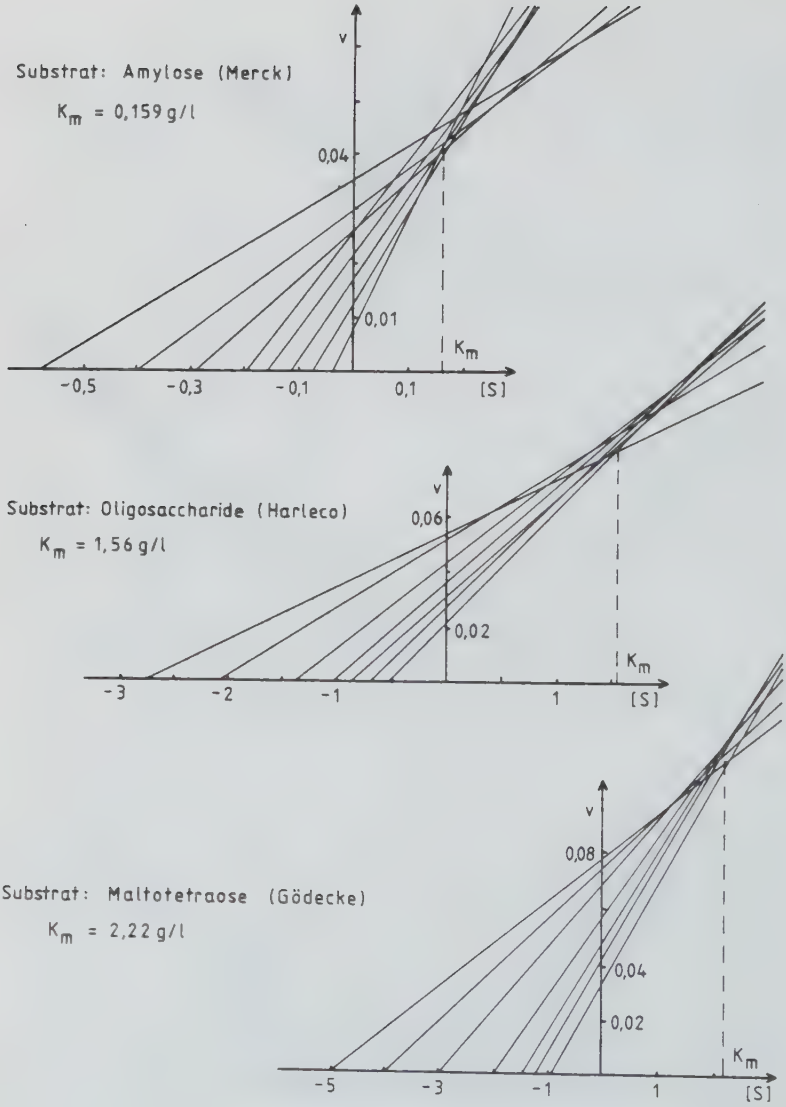


Abb. 4d Speichelamylase

Diagramme nach Eisenthal und Cornish-Bowden

Abb. 4e

Pankreasmakroamylase

Substrat: Maltotetraose (Gödecke)

K_m = 1,76 g/l

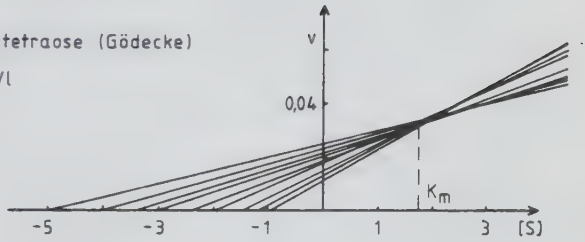


Abb. 4f

Speichelmakroamylase

Substrat: Maltotetraose (Gödecke)

K_m = 2,51 g/l

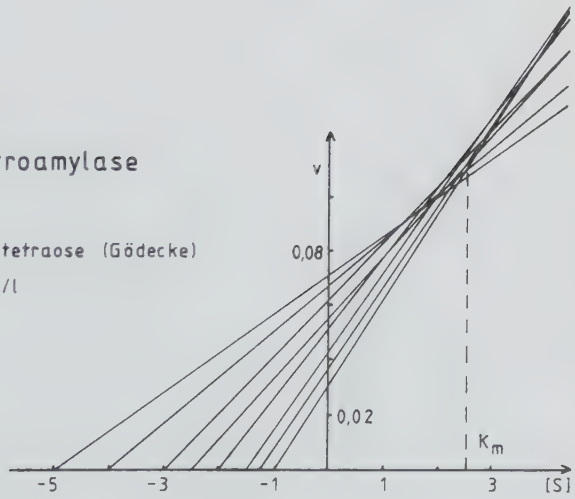
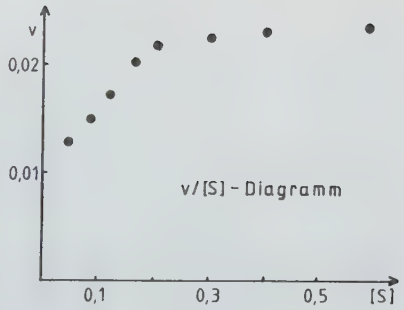
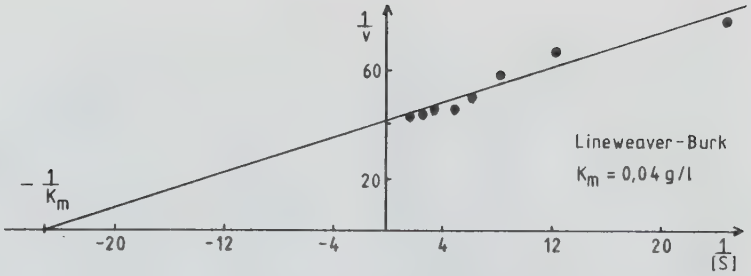
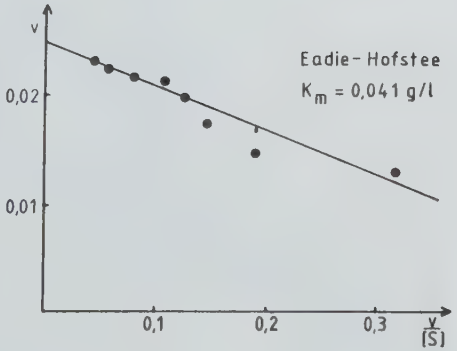


Diagramme nach Eisenthal und Cornish-Bowden







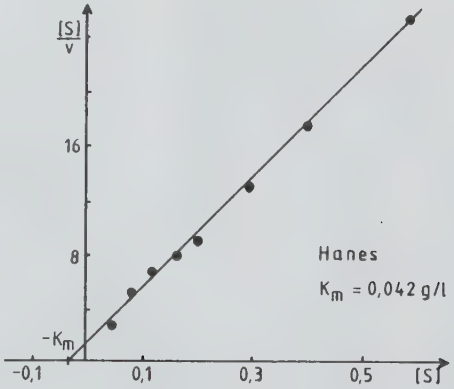
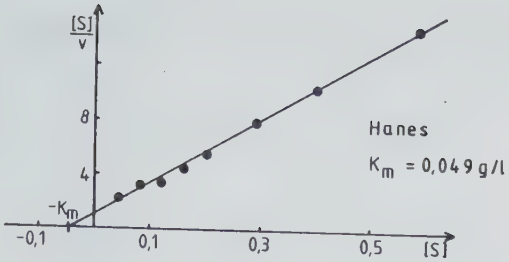
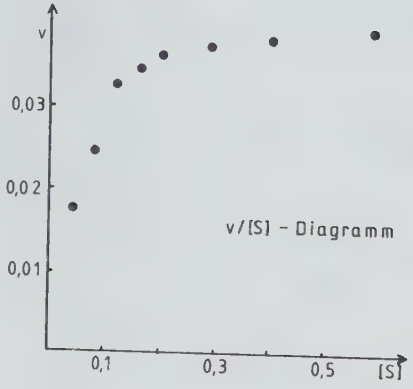
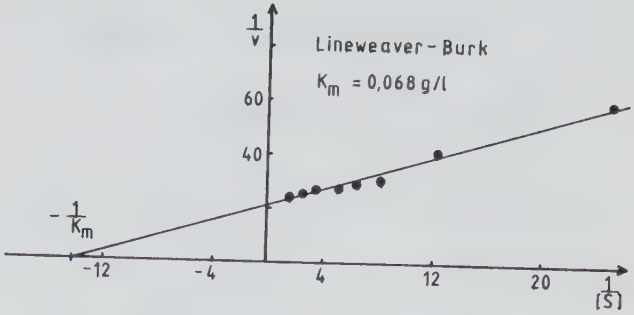


Abb. 5a Schweinepankreasamylase Substrat: Amylose (Merck)







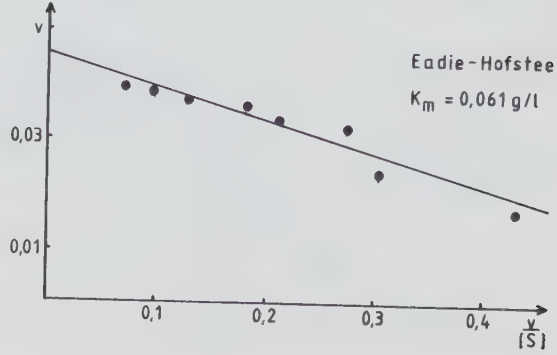
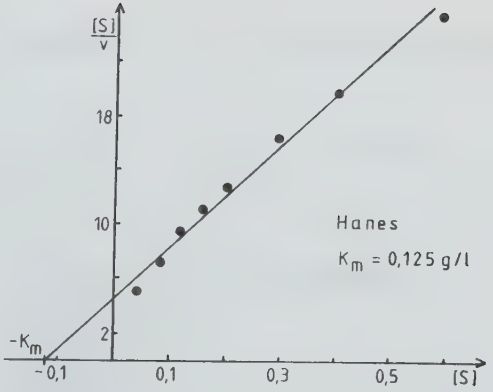
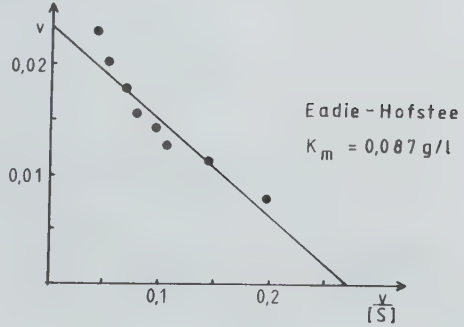
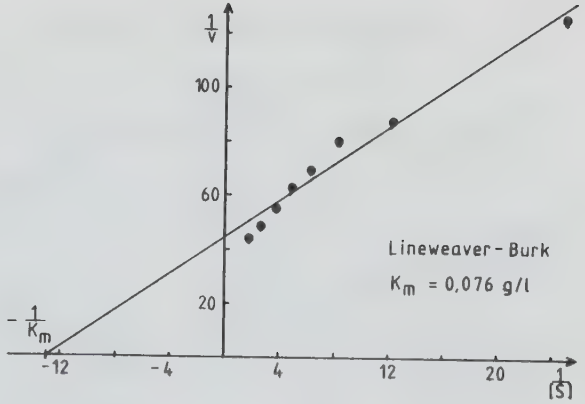


Abb. 5b Pankreasamylase

Substrat: Amylose (Merck)







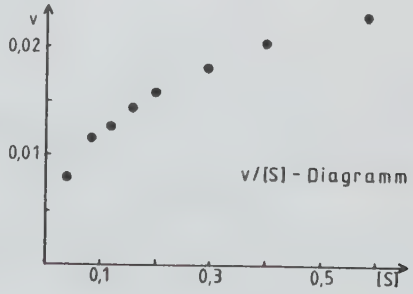
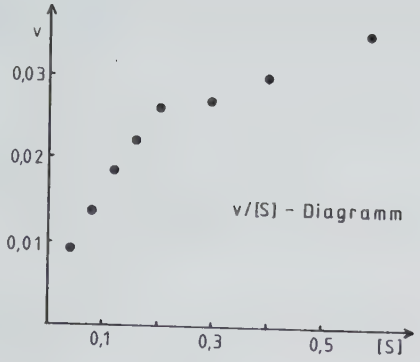
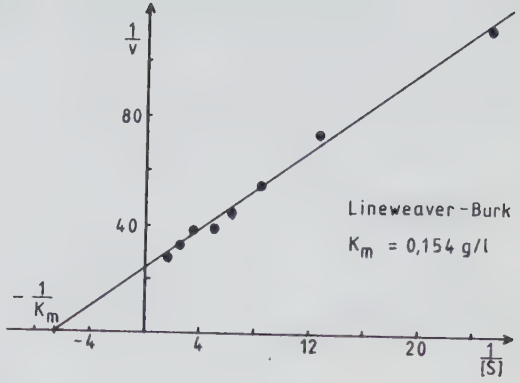
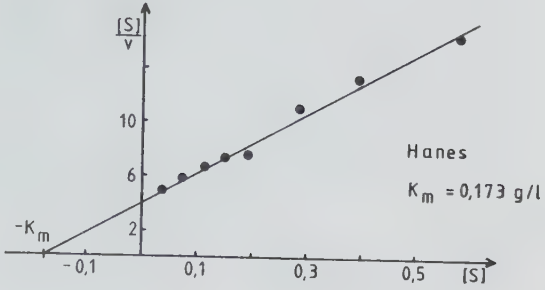


Abb. 5c Makroamylase

Substrat: Amylose (Merck)







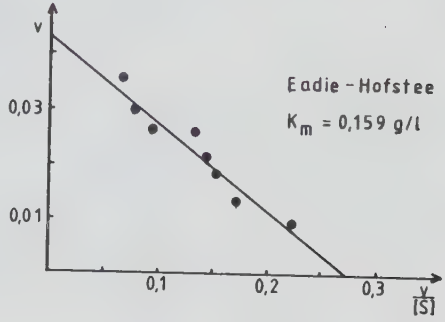
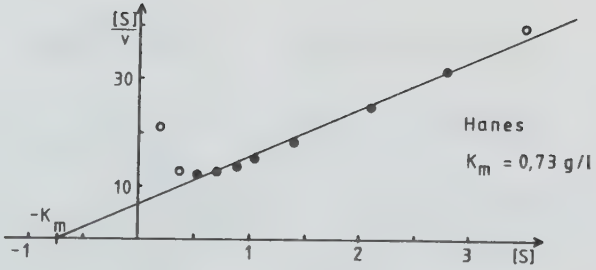
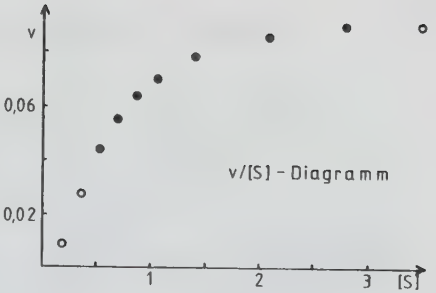
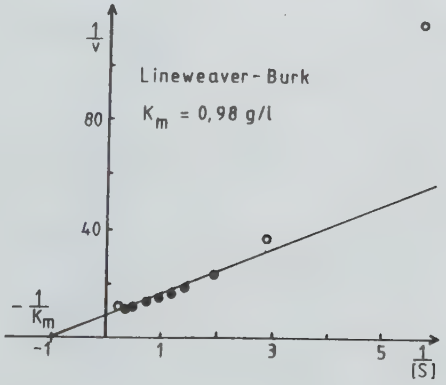


Abb. 5d Speichelamylase

Substrat: Amylose (Merck)







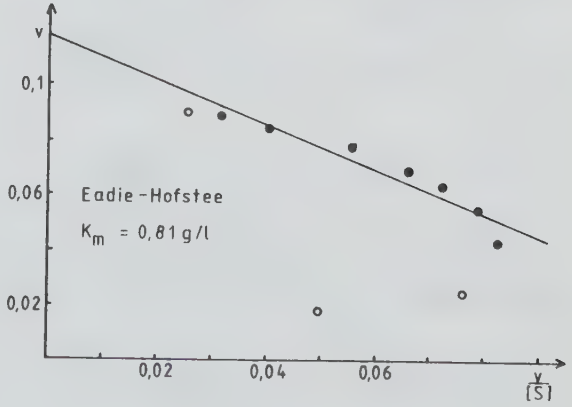
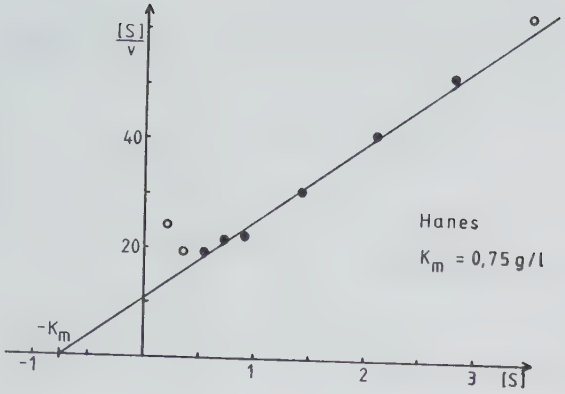
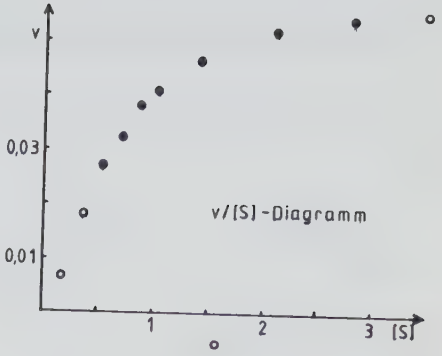
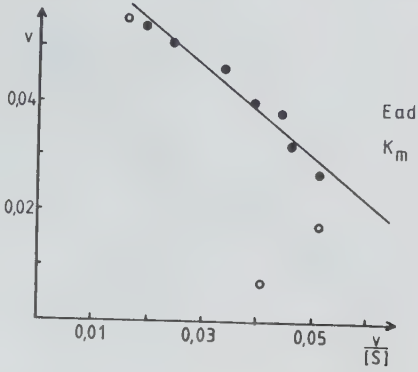


Abb. 6a Schweinepankreasamylase Substrat: Oligosaccharide (Harleco)







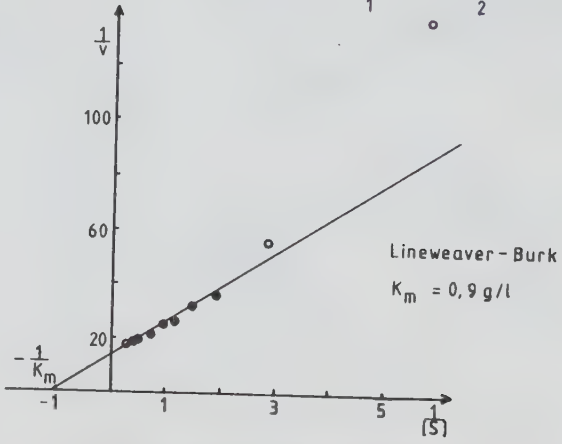
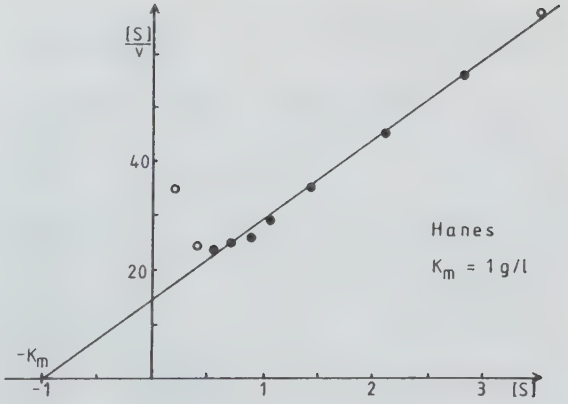
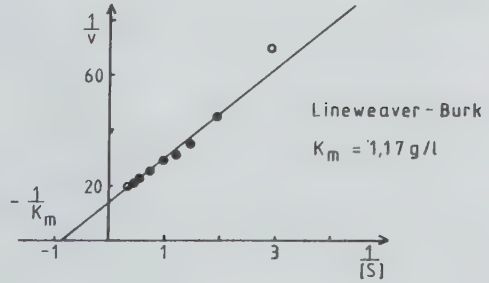
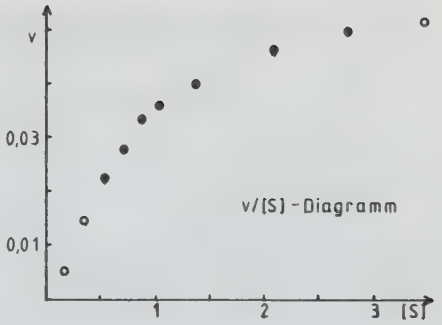


Abb. 6b Pankreasamylase

Substrat: Oligosaccharide (Harleco)







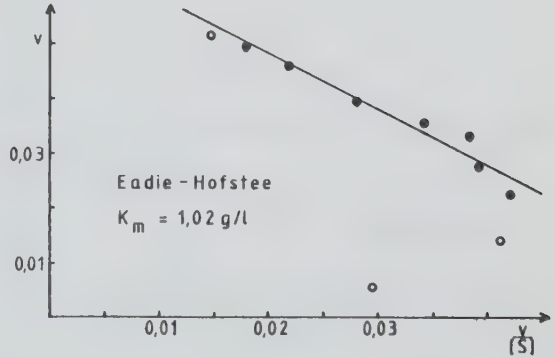
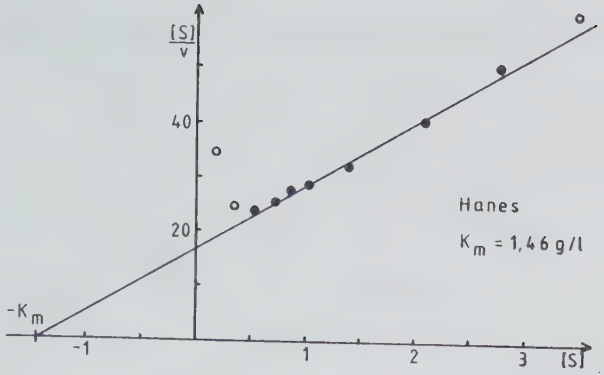


Abb. 6c Makroamylase Substrat: Oligosaccharide (Harleco)



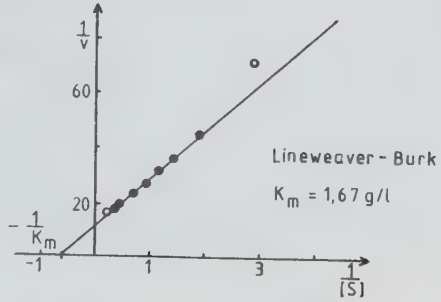
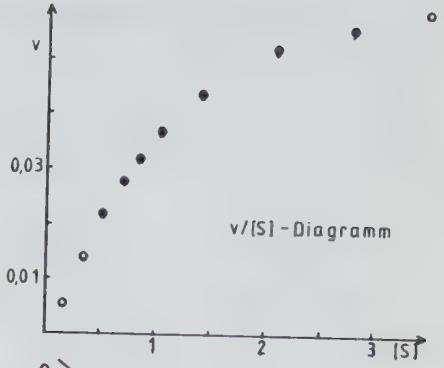
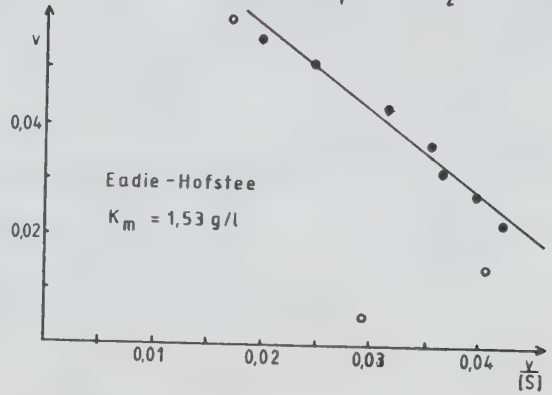
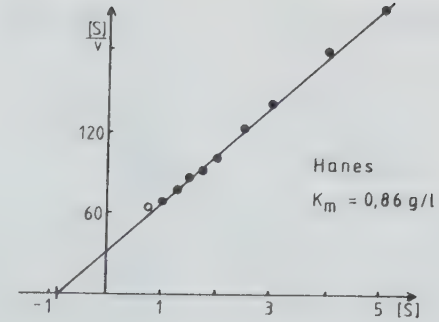


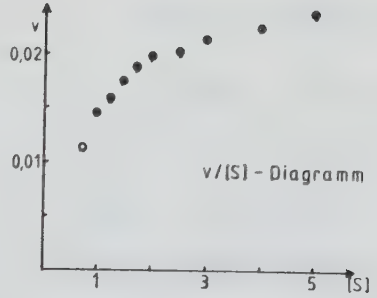
Abb. 6d Speichelamylase

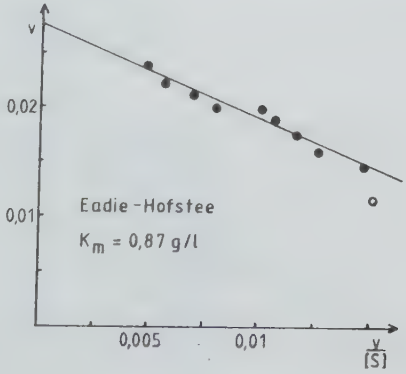




Substrat: Oligosaccharide (Harleco)







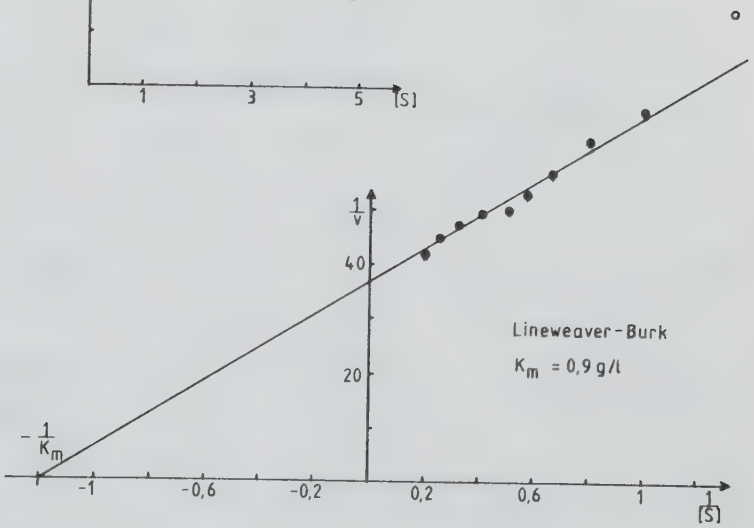
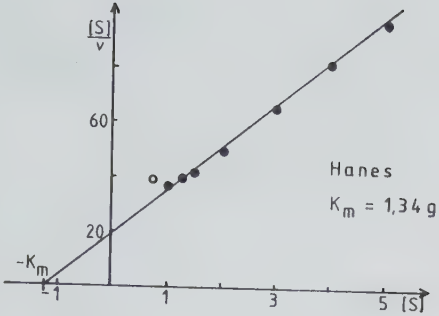
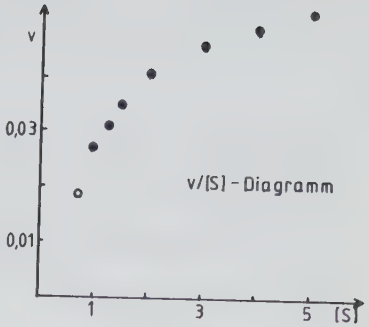
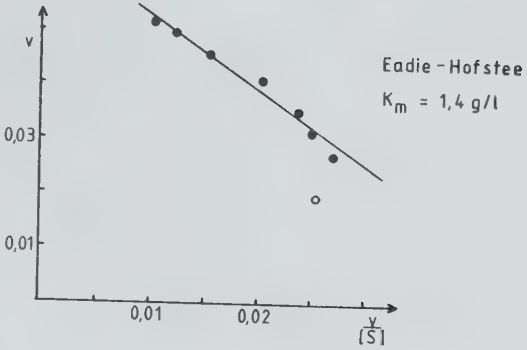


Abb. 7a Schweinepankreasamylase Substrat: Maltotetraose (Gödecke)







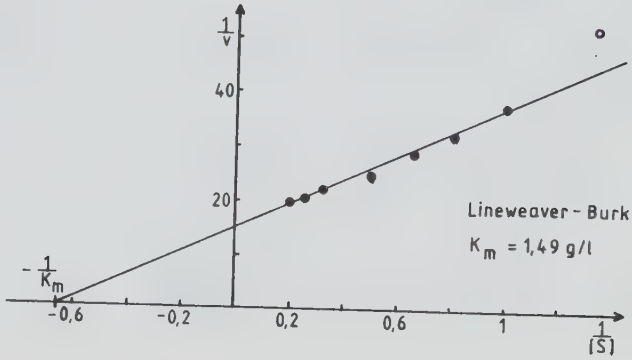
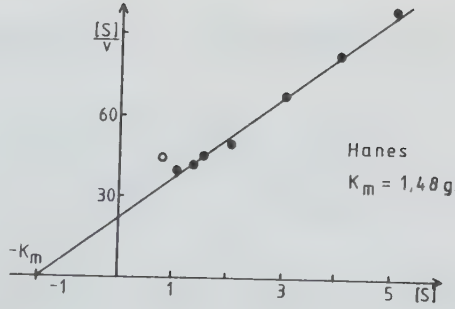
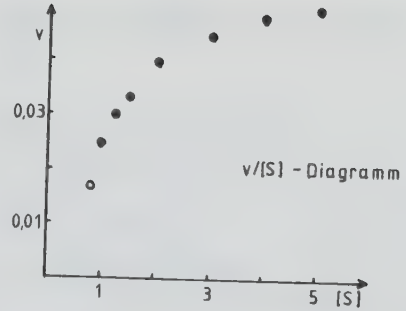
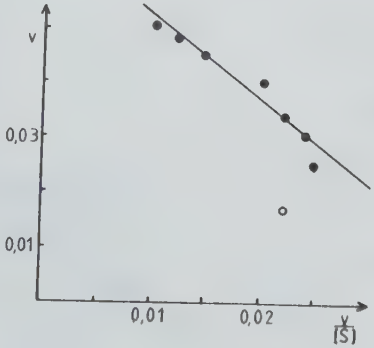


Abb. 7b Pankreasamylase Substrat: Maltotetraose (Gödecke)







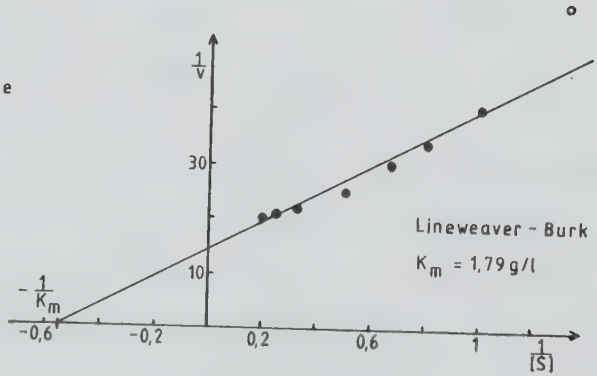
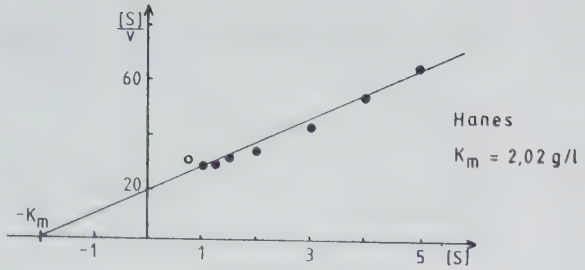
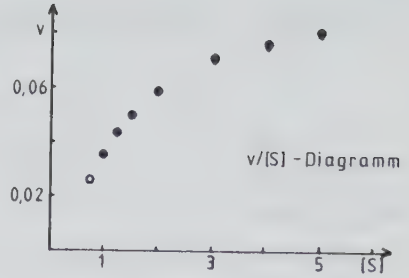
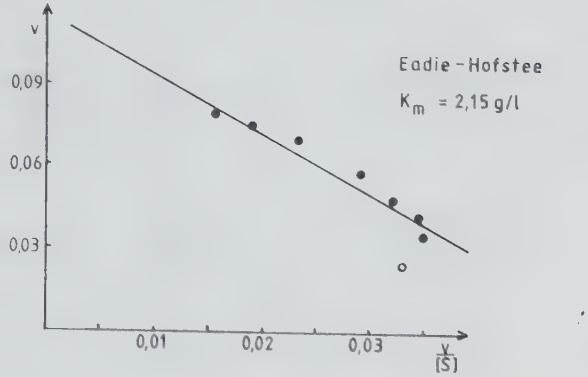


Abb. 7c Makroamylase Substrat: Maltotetraose (Gödecke)







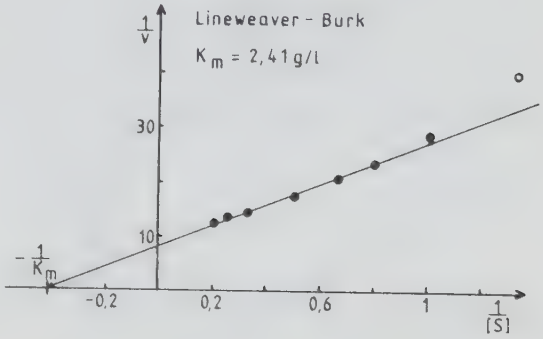
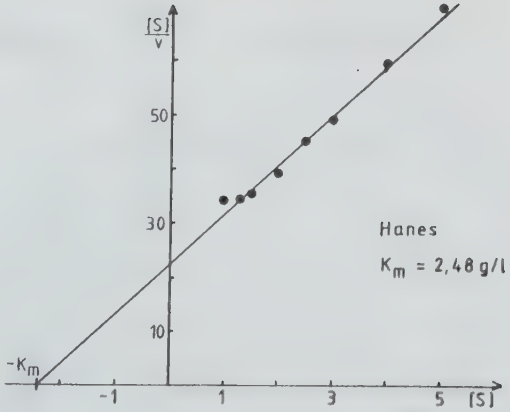
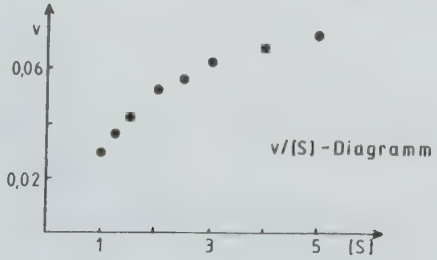
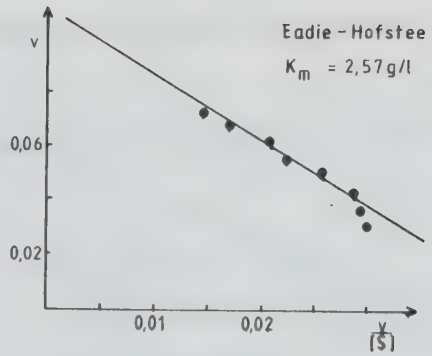


Abb. 7d Speichelamylase

Substrat: Maltotetraose (Gödecke)







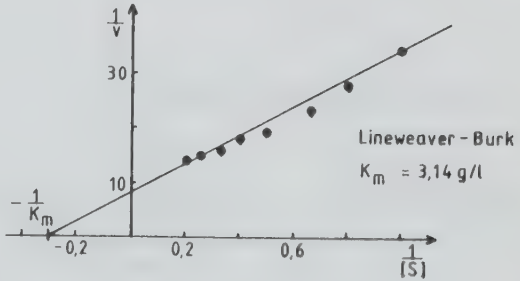
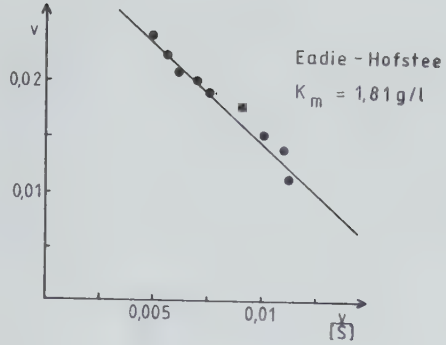
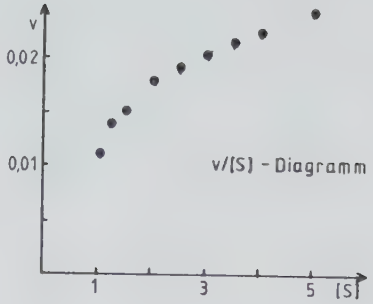
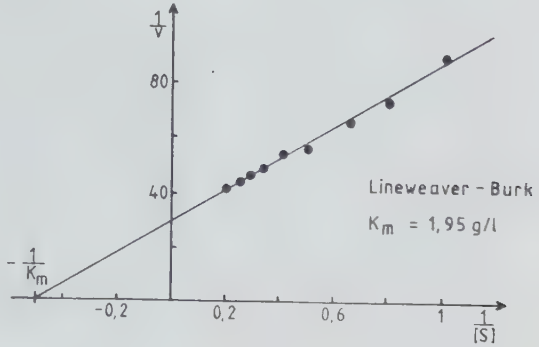


Abb. 7e Speichelmakroamylase Substrat: Maltotetraose (Gödecke)







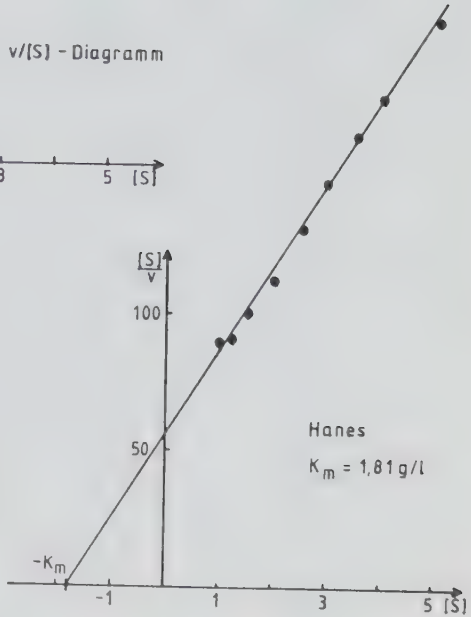


Abb. 7f Pankreasmakroamylase

Substrat: Maltotetraose (Gödecke)

3.2 Temperaturverhalten der Amylasen

3.2.1 Optimale Reaktionstemperatur

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 8 dargestellt. Die Amylaseaktivitäten sind als Teil der Aktivität bei 30°C, die gleich 1 gesetzt wurde, gegen die Reaktionstemperatur aufgetragen.
Der Kurvenverlauf bei der menschlichen Speichel-, Pankreas- und Makroamylase ist fast gleich. Die Aktivität steigt um etwa den gleichen Prozentsatz an. Sie verdoppelt sich von 25°C auf 40°C Reaktionstemperatur. Das Aktivitätsmaximum liegt bei Makro- und Speichelamylase bei 40°C, bei der Pankreasamylase zwischen 40°C und 45°C.
Die Schweinepankreasamylase setzt sich am deutlichsten gegen die anderen 3 Amylasen ab. Ihre Aktivität verdreifacht sich von 25°C auf 45°C Reaktionstemperatur, ihr Maximum liegt bei 45°C.
Zwischen 45°C und 50°C fällt die Aktivität aller 4 Amylasen steil ab.

Bei der Schweinepankreasamylase, die in diesem Fall als Beispiel gewählt wurde, wurden die 47,5°C-Proben, nachdem ihre Aktivität gemessen war, im Photometer auf 40°C abgekühlt und nochmals gemessen. Die Aktivität dieser Proben stieg wieder an, und zwar auf 0,6 des Bezugswerts bei 30°C, während sie bei 47,5°C nur eine Aktivität von 0,18 des Bezugswerts hatten. Allerdings wurde bei weitem nicht mehr der ursprüngliche 40°C-Wert (1,8) erreicht.

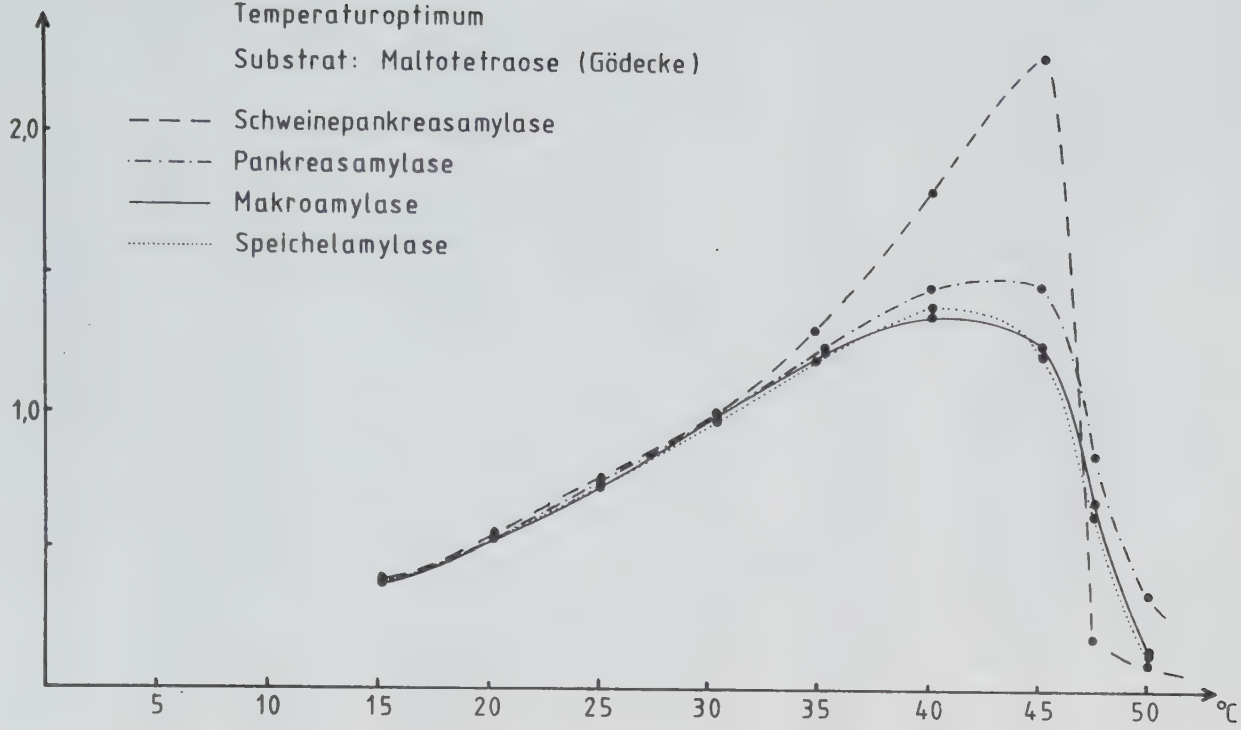
3.2.2 Thermische Stabilität des Gödecketestreagenzes (Substrat: Maltotetraose)

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tab. 7 zusammengefaßt. Nur nach Inkubation des Gödecketestreagenzes bei 65°C sind die Reaktionsgeschwindigkeiten deutlich niedri-

Abb. 8

Temperaturoptimum

Substrat: Maltotetraose (Gödecke)



ger als bei den Vergleichsreaktionen mit nur bei 30°C inkubiertem Reagenz.

Tab. 7: Reaktionsgeschwindigkeiten in ΔE/min bei 30°C Reaktionstemperatur nach Vorinkubation des Gödecketestreagenzes (Substrat: Maltotetraose) bei 47°C, 55°C und 65°C und bei nur auf 30°C temperiertem Gödecketestreagenz

	ΔE/min	ΔE/min bei 30°C
nach Inkubation bei 47°C		
Speichelamylase	0,077	0,068
nach Inkubation bei 55°C		
Pankreasamylase	0,051	0,051
Schweinepankreasamylase	0,011	0,0116
nach Inkubation bei 65°C		
Speichelamylase	0,036	0,061
Makroamylase	0,014	0,03
Pankreasamylase	0,024	0,041

3.2.3 Thermische Stabilität der Amylasen

In den Abb. 9, 10 und 11 ist die Amylaseaktivität als Teil der Ausgangsaktivität, die gleich 1 gesetzt wurde, gegen die Dauer der Inkubation aufgetragen. Ausgangsaktivität war die Aktivität bei Raumtemperatur, die kurz vor Beginn der Inkubation bestimmt wurde. Zuerst wurde bei diesem Versuch die Amylaseaktivität mit Maltotetraose als Sub-

strat bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Abb. 9:

bei 47°C: Die Aktivität der 3 Isoamylasen steigt geringfügig (um 1 - 7%), die der Makroamylase steigt stark (in 145 Min. auf 152% der Ausgangsaktivität).

bei 55°C: Die Aktivität der Pankreas- und Speichelamylase steigt wiederum geringfügig an (um 7 - 8%), die der Makroamylase steigt in 180 Min. auf 187% der Ausgangsaktivität, die Schweinepankreasamylase beginnt abzufallen.

bei 65°C: Alle 4 Amylasen verlieren an Aktivität. Die Schweinepankreasamylase fällt am schnellsten ab, es folgt die Pankreas- und dann die Speichelamylase. Die Makroamylase fällt am langsamsten.

Wegen des überraschenden Aktivitätanstiegs der Makroamylase während der 47°C- und 55°C-Inkubation wurde der Versuch bei diesen beiden Temperaturen wiederholt und diesmal die Amylaseaktivität gleichzeitig im ACA (Maltopentaose als Substrat) und mit dem Harlecotest (Oligosaccharide als Substrat) bestimmt (Abb. 10 und 11):
Bei der Messung im ACA (Abb. 10) kommt es zu einem vorübergehenden Steilanstieg der Makroamylaseaktivität bei 47°C Inkubationstemperatur. Bei 55°C ist kein Anstieg mehr zu erkennen, die Schweinepankreasamylase beginnt zu fallen.

Bei der Aktivitätsmessung anhand der Oligosaccharide (Abb. 11) unterscheidet sich die Makroamylase kaum von den 3 Isoamylasen. Nur gegen Ende der Inkubation bei 47°C erkennt man einen leichten Aktivitätsanstieg der Makroamylase, der etwas stärker als der der Isoamylasen ist. Während der Inkubation bei 55°C beginnt die Schweinepankreasamylase zu fallen.

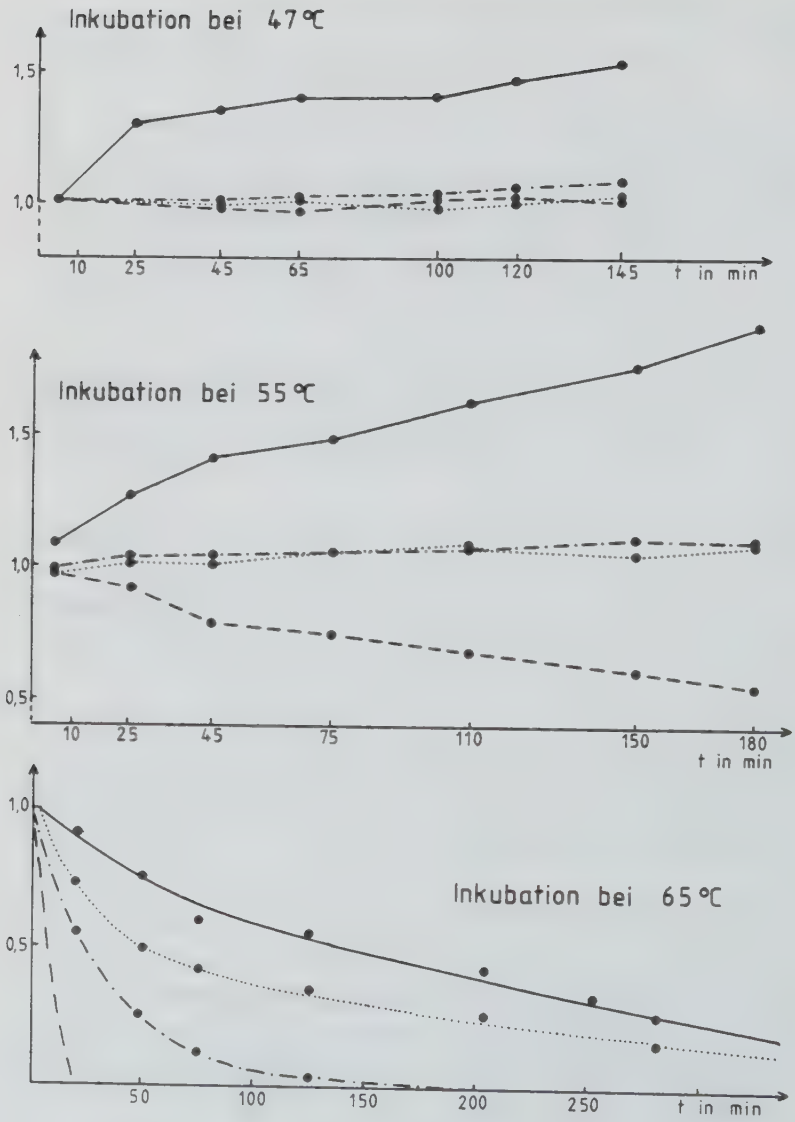
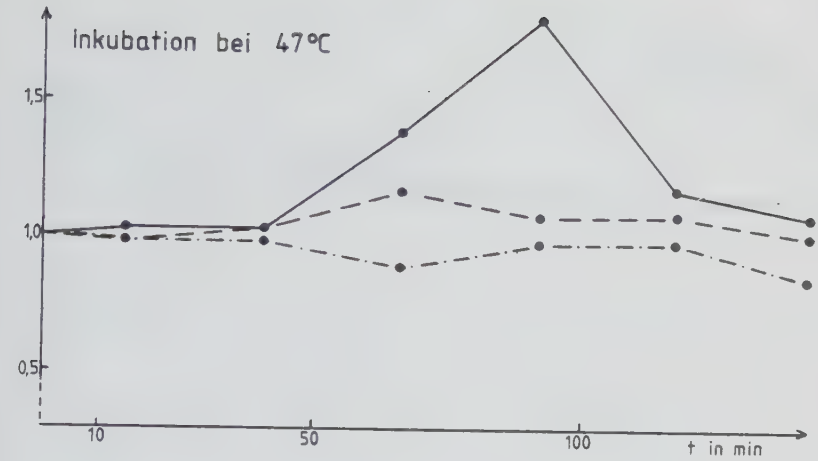


Abb. 9 Inkubation der Amylasen
Substrat: Maltotetraose (Gödecke)
Markierung der Amylasen wie in Abb. 8



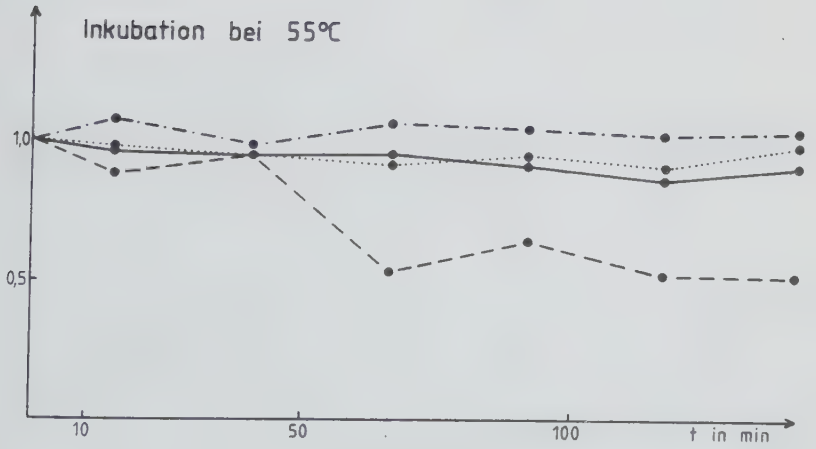
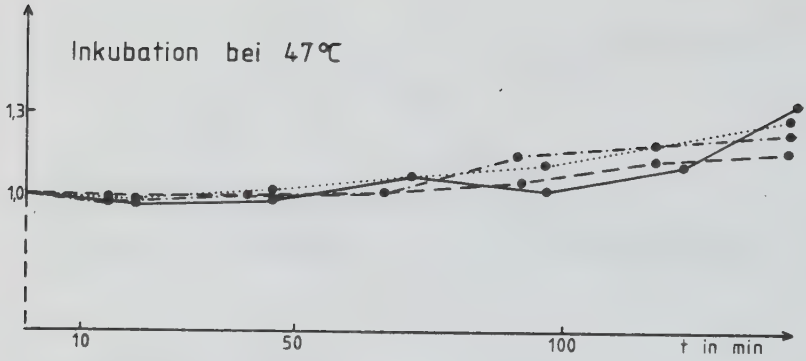


Abb. 10 Inkubation der Amylasen

Substrat: Maltopentaose (Du Pont ACA)

Markierung der Amylasen wie in Abb. 8



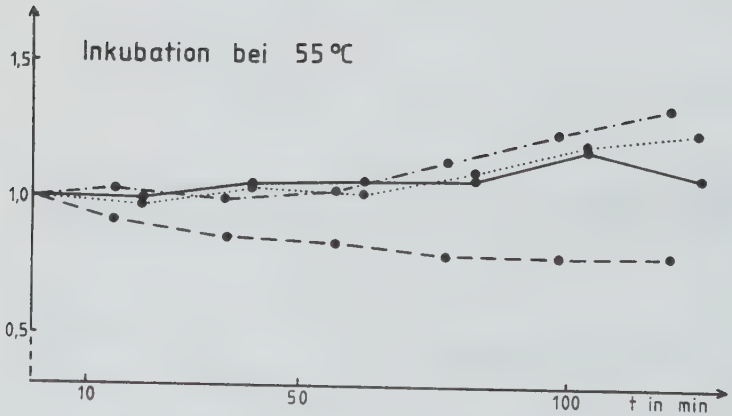


Abb. 11 Inkubation der Amylasen

Substrat: Oligosaccharide (Harleco)

Markierung der Amylasen wie in Abb. 8

3.2.4 Stabilität der Amylasen bei Raumtemperatur

Die Aktivität der Makroamylase, Pankreas- und Schweinepankreasamylase blieb den ganzen Meßzeitraum über (einen Monat) stabil, die der Speichelamylase sank geringfügig (um 15% der Anfangsaktivität) ab.

4. DISKUSSION

4.1 Testvergleich

Die Michaeliskonstanten der verschiedenen Amylasen wurden für 3 Substrate, d.h. anhand von 3 Tests, bestimmt. Zunächst interessierte die Amylose, das physiologische Substrat der Amylase. Hier bot sich der Mercktest "α-Amylase" an, der Amylose als Substrat enthält.
Vergleicht man die Tab. 2, 3 und 4 miteinander, in denen die Meßwerte der Reaktionsgeschwindigkeit v aufgetragen sind, so sieht man, daß die im Mercktest erhaltenen Werte (Tab. 2) am meisten streuen.
Fehler können zunächst durch die vielen Pipettierschritte entstehen. Doch die in sich recht gerade verlaufenden Extinktion/Zeit-Kurven (Abb. 2) der einzelnen Reaktionen zeigen, daß die Fehler beim Entnehmen der Reaktionsproben nach bestimmten Zeitabständen nicht sehr bedeutend waren.

Am auffallendsten ist, daß die Steigung der Kurven, d.h. die ΔE/min-Werte, bei gleicher Substratkonzentration so unterschiedlich sind. Dies könnte am ungenauen Pipettieren bei Reaktionsstart liegen. Es wurde dabei aber unter den gleichen Bedingungen gearbeitet wie bei den anderen beiden Tests.
Ein weiterer Grund für die Meßungenauigkeit könnte die Tatsache sein, daß Amylose als Makromolekül kein genau definiertes Molekulargewicht hat. Aus der Abnahme der Blaufärbung der Lösung um einen bestimmten Betrag kann man nicht genau auf eine bestimmte Anzahl gespaltener Glykosidbindungen schließen.
Dem exakteren Bestimmen von ΔE/min durch sehr viele Messungen steht der große Zeitaufwand entgegen, den der Mercktest erfordert.

Da im Mercktest keine optimale Meßgenauigkeit zu erreichen war und da auch interessierte, wie sich die Amylasen ge-

genüber anderen Substraten verhielten, wurden noch 2 vollenzymatische Tests dazugenommen, die Substrate mit definiertem Molekulargewicht besaßen. Das war der "UltraZyme Plus α-Amyl"-Test von Harleco, der Oligosaccharide als Substrat benutzt, und der "EnzAmyl-K"-Test von Gödecke, der Maltotetraose als Substrat enthält.
In beiden Tests wird das Substrat zu Maltose abgebaut, und deren Bildung wird über enzymatische Folgereaktionen anhand der NADH-Zunahme gemessen.
Vorteil der beiden kinetischen Tests gegenüber dem Mercktest ist, daß die Amylaseaktivität anhand genau definierter Substrate und Reaktionen gemessen wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit v kann kontinuierlich im Photometer anhand der NADH-Zunahme verfolgt werden und muß nicht wie beim Mercktest durch Probenentnahme aus dem Reaktionsgemisch ermittelt werden. Allein durch die geringere Anzahl von Arbeitsschritten sind weniger Fehlerquellen vorhanden als beim Mercktest.
Der einzige Nachteil der beiden kinetischen Tests gegenüber dem Mercktest ist, daß der Hersteller Substrat und Hilfsenzyme in einem Reagenz liefert, d.h. sie können nicht getrennt voneinander aufgelöst werden. Wird das Reagenz verdünnt, so liegen nicht nur das Substrat sondern auch die Hilfsenzyme in immer niedrigerer Konzentration vor. Daraus folgt, daß nicht beliebig starke Verdünnungen hergestellt werden dürfen, damit die Hilfsenzyme immer noch im Überschuß vorliegen. Ist dies nicht mehr der Fall, so können sie eventuell die Reaktionsgeschwindigkeit mitbeeinflussen.

Wie schon in 3.1 erwähnt, ergeben sich beim Gödecke- und Harlecotest in den 3 linearen Diagrammen Kurven, die zum Rand hin immer stärker gekrümmt verlaufen. Dies kommt dadurch zustande, daß bei den höchsten und niedrigsten Substratkonzentrationen eine im Verhältnis zu den mittleren Substratkonzentrationen viel zu niedrige Reaktionsgeschwindigkeit gemessen wird.

Im Bereich der hohen Konzentrationen könnte dies einer Substrathemmung entsprechen (vgl. Abb. 12a mit Abb. 6 und 7).

Bei den niedrigen Substratkonzentrationen, bei denen die Abweichung von der Geraden sehr viel ausgeprägter ist, wären die Kurvenverläufe typisch für positiv kooperatives Verhalten eines Enzyms (vgl. Abb. 12b mit Abb. 6 und 7). Die Amylase, bei der bis zu 5 Bindungszentren postuliert werden (13), wäre zur kooperativen Ligandenbindung auch durchaus fähig.
Im Mercktest, in dem Amylose als Substrat dient, war jedoch keine solche systematische Abweichung von der Geraden zu erkennen. Auch in anderen Arbeiten, in denen Stärke (10) und Cibacron Blue F3GA-Amylose (9) zur K_m-Bestimmung verwandt wurden, verhielt sich die Amylase entsprechend der Michaelis-Menten-Beziehung, d.h. in den linearen Diagrammen bildeten die Meßwerte Geraden, keine Kurven. Man könnte vermuten, daß die Amylase bei verschiedenen Substraten verschiedenen Reaktionsmechanismen folgt.
Der einem positiv kooperativen Verhalten entsprechende Kurvenverlauf bei Harleco- und Gödecketest könnte aber auch auf die Testbedingungen zurückzuführen sein. Beim Verdünnen des Testreagenzes kommt man dem Bereich immer näher, in dem die Hilfsenzyme nicht mehr im Überschuß vorliegen. Ein kurzes Zahlenbeispiel soll dies belegen:

Der Harlecotest ist im Serum bis zu einer Amylaseaktivität von 1000 U/l linear. Die Aktivität meiner Amylaselösungen betrug, unter Originalbedingungen (25°C Reaktionstemperatur) gemessen, durchschnittlich 330 U/l. Verdünnt man das Testreagenz um den Faktor 3, so ist der Test nur noch bis zu einer Amylaseaktivität von 333 U/l linear, d.h. bei der Aktivität meiner Lösungen wäre dies schon die höchstmögliche Verdünnung.
Man muß aber beachten, daß das Substrat mitverdünnt wird, was bedeutet, daß die Amylaseaktivität mit zunehmender Verdünnung auch abnimmt. Die Grenze, bis zu der der Test linear ist, verschiebt sich also in Richtung der stärkeren

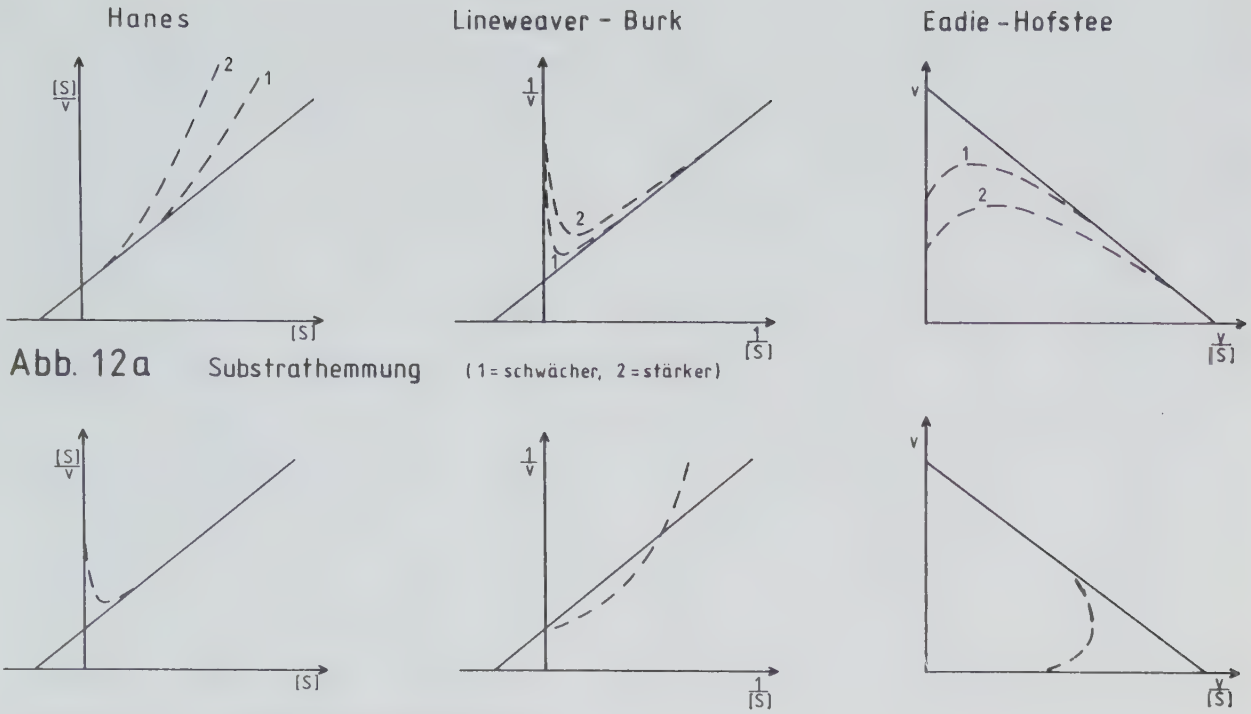


Abb. 12a Substrathemmung (1 = schwächer, 2 = stärker)

Abb. 12b positive Kooperativität

(aus Bisswanger, H.: Theorie und Methoden der Enzymkinetik (2), S. 102 und 124)

Verdünnungen. Ab welcher Verdünnung die Hilfsenzyme endgültig nicht mehr im Überschuß vorliegen, läßt sich nicht genau berechnen. Es ist aber durchaus vorstellbar, daß dies bei den stärksten Verdünnungen, die ich herstellte, mit Oligosaccharidkonzentrationen von 0,35 g/l und 0,175 g/l (um Faktor 10 und 20 verdünnt) schon der Fall ist.
Sind die Hilfsenzyme aber nicht mehr im Überschuß vorhanden, so können die von ihnen katalysierten Reaktionen geschwindigkeitsbestimmend werden; dann nämlich, wenn sie langsamer ablaufen als die zu messende Reaktion, die Spaltung der Oligosaccharide durch die Amylase. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird zu niedrig bestimmt. Es kommt zu einem Kurvenverlauf, wie wir ihn in Abb. 6 und 7 sehen.

Ein Hinweis für die Richtigkeit dieser Vermutung könnte auch die Tatsache sein, daß mit zunehmender Verdünnung die Zeit bis zum Erreichen des linearen Kurventeils, die ja einer "Anlaufphase" der Hilfsreaktionen entspricht, immer länger wird.
Dagegen wird die lineare Phase, bei der die Reaktion ihre Höchstgeschwindigkeit erreicht hat, immer kürzer, sodaß es bei den niedrigsten Substratkonzentrationen immer schwieriger wird, $\Delta E/min$ richtig, d.h. nicht zu niedrig zu bestimmen (vgl. Abb. 3).
Was am Beispiel des Harlecotests gezeigt wurde, gilt ebenso für den Gödecketest. Die Kurven sind hier weniger ausgeprägt, da gleich von Anfang an nicht so starke Verdünnungen wie beim Harlecotest hergestellt wurden (nur bis zum Faktor 10).
Ob der Kurvenverlauf beim Harleco- und Gödecketest auf die Testbedingungen zurückzuführen ist oder ob die Amylase bei den in diesen beiden Tests verwandten Substraten einem anderen Reaktionsmechanismus folgt, könnte nur dann geklärt werden, wenn die Substrate getrennt von den übrigen Bestandteilen des Reagenzes verdünnt werden könnten.

4.2 Michaeliskonstanten

Die größte Affinität zeigten die Amylasen für ihr physiologisches Substrat, die Amylose. Die K_m-Werte liegen hier deutlich niedriger als bei den anderen beiden Substraten.

In den Versuchen, in denen Amylose und Oligosaccharide als Substrate verwandt wurden, liegen die Werte der Pankreasamylasen von Mensch und Schwein dicht beieinander. Die beiden Isoamylasen sind aber nicht identisch. Die Schweinepankreasamylase hat immer einen niedrigeren K_m-Wert, was bei der Maltotetraose besonders deutlich wird.
Bei allen drei geprüften Substraten hatte Schweinepankreasamylase die kleinste, Speichelamylase die größte K_m, die Pankreasamylase lag dazwischen. KLEIN und FOREMAN (9), die mit Cibacron Blue F3GA-Amylose als Substrat die K_m der 3 Isoamylasen bestimmten, kamen zu dem gleichen Ergebnis. Auch TAKEUCHI (17), der nur die menschliche Speichel- und Pankreasamylase untersuchte, fand für die Speichelamylase eine höhere K_m als für Pankreasamylase. Als Substrat verwandte er Stärke.
Die Erhöhung der K_m durch die Makrokomplexbildung ist schon früher beschrieben worden. LEVITT und COOPERBAND (10) bestimmten die K_m ihres MA-Falls im Vergleich zu normaler Serumamylase, wobei sie Stärke als Substrat verwandten. Mit einer K_m von 0,129g/100 ml lag die Makroamylase deutlich höher als die normale Serumamylase, deren K_m (0,081 - 0,106g/100 ml) aus mehreren Normalseren bestimmt wurde. Nach Säuredissoziation des Makrokomplexes hatte die dabei erhaltene Amylase eine K_m von 0,094g/100 ml, was einer normalen Serumamylase entsprach. BERK et al. (1) führten dieselben Versuche, ebenfalls mit Stärke als Substrat, an 12 Makroamylaseseren durch und kamen zum gleichen Ergebnis wie LEVITT und COOPERBAND.
Auch in unserem Fall zeigt der Vergleich zwischen der in vitro hergestellten Speichel- und Pankreasmakroamylase und der normalen Speichel- und Pankreasamylase, daß die K_m

durch die Bindung der Amylase im Makrokomplex erhöht wird, d.h. die Affinität zum Substrat herabgesetzt wird.

Es fällt auf, daß die K_m-Werte der in vitro hergestellten Pankreasmakroamylase und der Patientenmakroamylase sehr nahe beieinander liegen. Dies bestätigt die Tatsache, daß im Fall unserer Patientin vor allem Pankreasamylase im Makrokomplex gebunden war (3).

4.3 Temperaturverhalten

Die im Versuch 2.5.1 bestimmten optimalen Reaktionstemperaturen der 3 Isoamylasen und der Makroamylase decken sich mit dem Temperaturoptimum der meisten Enzyme, das zwischen 40°C und 50°C liegt (2). Die Schweinepankreasamylase unterscheidet sich in diesem Versuch deutlich von den 3 menschlichen Amylasen. Sie hat einen sehr viel stärkeren Aktivitätsanstieg als diese (vgl. 3.2.1).
HENDERSON et al. (7) beschrieben eine Methode, bei der Makroamylase dadurch entdeckt wurde, daß sie bei steigender Reaktionstemperatur einen sehr viel höheren Aktivitätsanstieg zeigte als normale Serumamylase: Bei Erhöhung der Reaktionstemperatur von 25°C auf 45°C stieg bei ihnen die Aktivität normaler Serumamylase um den Faktor 4, die der Makroamylase um den Faktor 8 (Aktivitätsbestimmung mit Phadebas-Test).
Unser recht "klassischer" Fall einer Makroamylasämie wäre mit dieser von HENDERSON et al. vorgeschlagenen Screening-Methode nicht entdeckt worden. Die Makroamylase (vgl. 3.2.1) unterschied sich nicht von normaler Pankreas- und Speichelamylase, weder im Temperaturoptimum noch im relativen Aktivitätsanstieg. Auch der Aktivitätsanstieg insgesamt war bei meinem Versuch nicht so hoch (nur um Faktor 2 bis 3).
Der Abfall der Amylaseaktivität zwischen 40°C, bzw. 45°C und 50°C kann nicht ausschließlich auf einer irreversiblen

thermischen Schädigung der Amylase beruhen. Dies zeigt der deutliche Wiederanstieg der Aktivität des 47,5°C-Reaktionsgemischs nach Abkühlung auf 40°C (am Beispiel der Schweinepankreasamylase geprüft), wobei jedoch der Ausgangswert nicht mehr erreicht wurde. Man muß den Abfall der Amylaseaktivität in 3.2.1 also als teilweise reversible thermische Inaktivierung der Amylasen oder Hilfsenzyme bezeichnen.

Aus den Ergebnissen des Versuchs 2.5.2, bei dem das Gödeckereagenz bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und auf seine Stabilität hin geprüft wurde, kann folgendes geschlossen werden (vgl. Tab. 7):

a) Die Inkubation bei 47°C scheint das Testreagenz etwas zu aktivieren.
b) Die Inkubation bei 55°C hat überhaupt keinen Einfluß auf das Reagenz.
c) Die Inkubation bei 65°C führt zu einer erheblichen thermischen Schädigung des Testreagenzes.

Dies bedeutet, daß bei der gewählten Inkubationsdauer von 20 Minuten erst bei Inkubationstemperaturen über 55°C eine thermische Schädigung des Testreagenzes zu erwarten ist. Dies bedeutet weiter, daß im Versuch 2.5.1 der Abfall der Amylaseaktivität, der im Bereich zwischen 40°C und 50°C stattfand, nicht durch eine irreversible thermische Schädigung des Testreagenzes verursacht war. Vor allem um dies auszuschließen, wurde die Stabilität des Testreagenzes geprüft.

Bei der Inkubation der Amylasen bei 65°C fiel die Aktivität der Makroamylase zuallerletzt ab. Anscheinend trägt die Komplexbildung zur Stabilität der Amylase bei (vgl. 3.2.3).
Während der Inkubation bei 47°C und 55°C, bei der die Aktivität der Amylasen mit Maltotetraose bestimmt wurde, überraschte der starke Anstieg der Makroamylaseaktivität.

Eine geringfügige Aktivitätssteigerung könnte noch auf die kurzfristige Temperaturerhöhung zurückzuführen sein, die die Substratlösung (30°C) durch Zugabe der Amylase (47°C oder 55°C) erfährt. Aber für den beobachteten Aktivitätsanstieg besonders der Makroamylase reicht diese Erklärung sicher nicht aus.
Möglich wäre, daß sich während der Inkubation bei diesen Temperaturen der Makrokomplex so lockert, daß zusätzliche Bindungsstellen der Amylase frei werden, die vorher im Komplex unzugänglich waren.
ILS fand bei seinen Untersuchungen (8), daß schon allein die Bildung des Komplexes aus Amylase und IgA (ohne jegliche Temperaturerhöhung) die spezifische Aktivität der Amylase erhöht. Er fügte einer gleichbleibenden Menge normaler Amylase steigende Mengen der aus dem Patientenserum erhaltenen Amylasebindenden Proteinfraktion zu und stellte dabei eine immer höhere Amylaseaktivität fest.
Bei der Wiederholung des Versuchs 2.5.3, bei der die Amylasen nur noch bei 47°C und 55°C inkubiert wurden, wurde die Aktivität im ACA und mit dem Harlecotest bestimmt.
Wie schon in 3.2.3 beschrieben, kam es bei der Messung im ACA (Maltopentaose als Substrat) nur noch bei 47°C Inkubationstemperatur zu einem deutlichen Aktivitätsanstieg der Makroamylase. Wurden Oligosaccharide als Substrat verwandt (Harlecotest), so unterschied sich die Makroamylase kaum noch von den 3 Isoamylasen.
Das Phänomen scheint also substratabhängig zu sein. Um es ausführlicher zu untersuchen, könnte man den Versuch mit weiteren Tests und auch bei anderen Inkubationstemperaturen wiederholen. Interessant wäre natürlich zu wissen, ob auch andere Makroamylasen diesen unerwarteten Aktivitätsanstieg zeigen.

5. Z U S A M M E N F A S U N G

Humane Speichel- und Pankreasamylase sowie Schweinepankreasamylase, Makroamylase einer Patientin und in vitro hergestellte Pankreas- und Speichelmakroamylase wurden enzymkinetisch untersucht und miteinander verglichen. An 3 verschiedenen Substraten wurden die Michaeliskonstanten (K_m) bestimmt und die Stabilität bei Inkubation bei verschiedenen Temperaturen geprüft. An einem Substrat (Maltotetraose) wurde die optimale Reaktionstemperatur ermittelt.

Bei den 3 Isoamylasen hatte Schweinepankreasamylase immer die niedrigste, Speichelamylase die höchste K_m, Pankreasamylase lag dazwischen. Die Bindung der Amylasen im Makrokomplex führte zu einer Erhöhung des K_m-Werts.

Die optimale Reaktionstemperatur lag zwischen 40°C (Makro- und Speichelamylase) und 45°C (Schweinepankreasamylase).

Bei der Inkubation der Amylasen bei 47°C, 55°C und 65°C war die Makroamylase am wärmestabilsten; bei 47°C und 55°C Inkubationstemperatur kam es im Gegensatz zu den übrigen Amylasen sogar zu einem Anstieg der Makroamylaseaktivität auf bis zu 187% der Ausgangsaktivität.

6. LITERATURVERZEICHNIS

(1) BERK, J.E., H. KLAU, F. GELLER and L. FRIDHANDLER: Macroamylasemia: Observations on the Nature of the Macroamylase
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131, 154-159 (1969)

(2) BISSWANGER, H.: Theorie und Methoden der Enzymkinetik. Eine Einführung für Biochemiker, Biologen und Mediziner
Weinheim, Deerfield Beach (Florida), Basel: Verlag Chemie 1979

(3) BOHNER, J., STEIN, W. und J. DILGER: Makroamylasämie: Immunglobulin A-Amylase-Komplexe als seltene Ursache einer Hyperamylasämie
Klin. Wochenschr. 58, 403-407 (1980)

(4) BROHEE, D. et A. DELCOURT: La macroamylasémie
Acta Gastro-Enterologica Belgica 40, 317-328 (1977)

(5) EISENTHAL, R. and A. CORNISH-BOWDEN: The Direct Linear Plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters.
Biochem. J. 139, 715-720 (1974)

(6) FRIDHANDLER, L. and J.E. BERK: Macroamylasemia
Advances in clinical chemistry 20, 267-286 (1978)

(7) HENDERSON, A.R., J. KING and C.W. IMRIE: Anomalous response of macroamylase to assay temperature
Clin. Chem. 19/1, 123-124 (1973)

(8) ILS, W.: Untersuchungen zum Bindeverhalten und zur Enzymkinetik eines IgA-Amylase-Komplexes (Makroamylase)
Dissertation an der Universität Tübingen, Medizinische Fakultät, noch unveröffentlicht.

(9) KLEIN, B. and J.A. FOREMAN: Amylolysis of a Chromogenic Substrate, Cibacron Blue F3GA-Amylose: Kinetics and Mechanism
Clin. Chem. 26/2, 250-253 (1980)

(10) LEVITT, M.D. and S.R. COOPERBAND: Hyperamylasemia from the binding of serum amylase by an 11 S IgA globulin
N. Eng. J. Med. 278, 474-478 (1968)

(11) LEVITT, M.D., E.J. GOETZL and S.R. COOPERBAND: Two forms of macroamylasemia
Lancet I, 957-958 (1968)

(12) LONG, W.B. and D.D. KOWLESSAR: A rapid thin layer test for macroamylase with observations on the nature of macroamylase in six patients
Gastroenterology 63, 564-571 (1972)

(13) LORENTZ, K.: α-Amylase Assay: Current State and Future Development
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 499-504 (1979)

(14) MARKUS, M., B. HESS, J.H. OTTAWAY and A. CORNISH-BOWDEN: The analysis of kinetic data in biochemistry. A critical evaluation of methods
FEBS Letters 63/2, 225-230 (1976)

(15) PORTER, W.R. and W.F. TRAGER: Improved Non-Parametric Statistical Methods for the Estimation of Michaelis-Menten Kinetic Parameters by the Direct Linear Plot
Biochem. J. 161, 293-302 (1977)

(16) TAKE, S., L. FRIDHANDLER and J.E. BERK: Macroamylasemia: possible role of polysaccharids in composition of macroamylase
Clin. Chim. Acta 27, 369-371 (1970)

(17) TAKEUCHI, T.: Human Amylase Isoenzymes Separated on Concanavalin A-Sepharose
Clin. Chem. 25/8, 1406-1410 (1979)

(18) WILDING, P., W.T. COOKE and G.I. NICHOLSON: Globulin-Bound Amylase. A Cause of Persistently Elevated Levels in Serum
Ann. Intern. Med. 60, 1053-1059 (1964)

L E B E N S L A U F

Am 10. Mai 1957 wurde ich, Barbara Haile, als Tochter des Frauenarztes Hermann Haile und seiner Frau Jutta, geb. Gogolewski, in Stuttgart - Bad Cannstatt geboren.

Nach vier Jahren Grundschule kam ich 1967 an das Johannes-Kepler-Gymnasium in Bad Cannstatt, wo ich im Mai 1976 das Abitur ablegte.

Im Herbst desselben Jahres begann ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen das Studium der Medizin. Dort legte ich im Sommer 1978 das Physikum ab und ein Jahr später den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Im Frühjahr 1980 famulierte ich zwei Monate lang am Charing Cross Hospital, London, in der Abteilung für Rheumatologie und Immunologie.

Im August 1981 legte ich in Tübingen den zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung ab. Danach ging ich nochmals für drei Monate nach London, diesmal an die neurologische Abteilung des Guy's Hospital.

Mein Praktisches Jahr absolvierte ich im Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart, mein Wahlfach war Gynäkologie. Am 19. 4. 1983 bestand ich in Stuttgart den dritten Teil der Ärztlichen Prüfung.